UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE
Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação

FRANCIANE BARBIERI FIÓRIO

ANÁLISE DA AÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS IDOSOS

Low level laser therapy in wound-repair process in aged rats

São Paulo, SP
2014.

FRANCIANE BABIERI FIORIO

ANÁLISE DA AÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS IDOSOS

Low level laser therapy in wound-repair process in aged rats

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.
Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

SÃO PAULO, SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Fiório, Franciane Barbieri.
Análise da ação do laser de baixa potência na cicatrização de feridas em idosos. /Franciane Barbieri Fiorio. 2014.
96 f.
Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.
Orientador (a): Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho.

1. Cicatrização de feridas. 2. Idosos. 3. Laser de baixa potência. 4. Mediadores inflamatórios.
I. Carvalho, Paulo de Tarso Camillo de. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 18 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): FRANCIANE BARBIERI FIORIO

Título da Dissertação: "Análise da ação do laser de baixa potência na cicatrização de feridas em ratos idosos".

Presidente: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO

Membro: PROFA. DRA. TATIANA DE SOUSA DA CUNHA UCHIYAMA

Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO

Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar o meu caminho e me confortar nos momentos difíceis vivenciados durante esta jornada,

Ao meu esposo pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha família pelo incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, pela confiança oferecida, paciência, ajuda e pelos ensinamentos.

Às técnicas do laboratório, em especial à Ângela, que sempre estiveram dispostas a me auxiliar nos experimentos.

Ao Brunno Lemes de Melo pelo auxílio na realização das análises.

À minha aluna Camila Dalbosco pelo auxílio na realização das fotografias das lâminas.

A todos os colegas do laboratório em especial à Caroline Rambo, Heliodora, Carolina Araruna, Evela, Ana, Vanessa e Camila pelas experiências trocadas e pela ajuda em todas as etapas dos estudos.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A otimização do tempo para a cicatrização de uma ferida é de suma importância, tendo em vista as sequelas que ela pode ocasionar e, esta otimização se torna ainda mais relevante no indivíduo com idade avançada, onde o reparo é mais lento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do laser de baixa potência na cicatrização em um modelo experimental de feridas cutâneas em ratos idosos. A ferida cutânea foi produzida no dorso do animal utilizando um "punch" de 8mm de diâmetro. Foram utilizados 45 ratos, machos, dos quais 15 jovens (± 30 dias) e 30 idosos (±500 dias), distribuídos em três grupos experimentais, controle jovem, controle idoso e tratado idoso, que foram submetidos à ferida cutânea, e o grupo idoso tratado recebeu tratamento com laser de baixa potência (30 mW, densidade de potência de 1,07 W/cm2), área do feixe de 0,028cm^2 e comprimento de onda de λ660nm, meio ativo de InGaAlP. Foram realizadas análises para verificar os efeitos do laser sobre a expressão de colágeno tipo I e III, MMP-3, MMP-9, TIMP-2 e VEGF através de imunoistoquímica, expressão de IL-6 através de RT-PCR e expressão de CINC-1 através de ELISA. Os resultados mostram que o laser diminuiu os níveis de IL-6 e IL-8, de MMP-3 e MMP-9, aumentou os níveis de TIMP-2 e VEGF e favoreceu a deposição de colágeno I e III nos três tempos experimentais (3, 7 e 14 dias). Podemos concluir que a laserterapia com os parâmetros utilizados foi eficaz no tratamento de feridas cutâneas em animais idosos, em diferentes fases do processo de reparação tecidual, modulando a expressão de mediadores do processo de reparo tecidual e deposição de colágeno.

Palavras Chave: Cicatrização de feridas; laser de baixa potência, idosos.

ABSTRACT

The optimization of time for the healing of a wound is very important, in view of the consequences it may cause, and this optimization becomes even more relevant in individuals with advanced age, where the repair is slower. The objective of this study was to evaluate the effect of low power laser on healing in an experimental model of skin wounds in aged rats. The skin wound was produced on the back using a "punch" 8mm diameter. 45 rats were males, of which 15 young people (± 30 days) and 30 elderly (± 500 days), divided into three groups, control young, control age and treated which underwent skin wound, and the group old treated received low-level laser treatment (30 mW, power density of 1.07 W / cm2), the area 0,028cm2 beam and wavelength λ660nm, active means of InGaAlP. Analyses were conducted to check the effects of laser on the expression of collagen type I and III, MMP-3, MMP-9, TIMP-2 and VEGF by immunohistochemical staining, IL-6 expression by RT-PCR and CINC-1 expression by ELISA. The results show that the laser decreased IL-6 and IL-8, MMP-3 and MMP-9, increased levels of TIMP-2 and VEGF, and favored collagen I and III deposition at the three time points (3, 7 and 14 days). We can conclude that laser therapy with the parameters used was effective in the treatment of skin wounds in aged animals at different stages of the process of tissue repair by modulating the expression of mediators of tissue repair and collagen deposition.

Keywords: Wound healing; low-power laser, aged.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **10**

LISTA DE TABELAS **13**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS **14**

1 CONTEXTUALIZAÇÃO **15**

1.1 REPARO TECIDUAL 19

1.1.1 Fase Inflamatória *20*

1.1.2 Fase Proliferativa *21*

1.1.3 Fase de maturação ou remodelamento *23*

1.2 IMPORTÂNCIA DO COLÁGENO 23

1.3 CICATRIZAÇÃO NO IDOSO 26

1.4 METALOPROTEINASES (MMPS) 28

1.5 PAPEL DAS METALOPROTEINASES NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS 32

1.6 ANGIOGÊNESE 35

1.7 LASER E O REPARO TECIDUAL 35

2 OBJETIVOS: **38**

2.1 OBJETIVO GERAL 38

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 38

3 MATERIAIS E MÉTODOS **39**

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO 39

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS 39

3.3 PROCEDIMENTOS 40

3.3.1 Produção das feridas cutâneas *40*

3.3.2 Aplicação do Laser *41*

3.3.3 Eutanásia *42*

3.3.4 Procedimentos Histológicos *43*

3.3.5 Imunoistoquímica *43*

3.3.6 Quantificação da expressão gênica da IL-6 ..... *44*

3.3.7 Avaliação dos níveis do mediador inflamatório CINC-1 ..... *45*

3.3.8 Análise das áreas marcadas pela imunoistoquímica *45*

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 46

4 RESULTADOS **47**

4.1 ARTIGO 47

5. DISCUSSÃO **74**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **85**

7. REFERÊNCIAS **86**

ANEXO 1 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 96
ANEXO 2 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das fases da cicatrização com especificidade celular..... 16

Figura 2. Composição dos grupos experimentais..... 38

Figura 3. Produção das Feridas cutâneas..... 39

Figura 4. Cartolina preta com uma abertura central, posicionada na região da ferida para impedir a incidência da luz nas regiões circunvizinhas e aplicação do Laser..... 40

Figura 5: Representação da análise das áreas imunomarcadas através do programa Image - Pro Plus ® 4.5..... 44

Figure 1 (paper): Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of collagen type I in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of collagen type I over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm…… 54

Figure 2 (paper): Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of collagen type III in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of collagen type III over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons 55

against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm……..……..

Figure 3: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of MMP-3 in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of MMP-3 over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm…….…… 5 7

Figure 4 (paper): Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of MMP-9 in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of MMP-9 over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm……..…….. 5 8

Figure 5 (paper): Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of TIMP-2 in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of TIMP-2 over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm……..…….. 6 0

Figure 6 (paper): Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of VEGF in wounds 7 days after injury. C shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of VEGF over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm…….. 61

Figure 7 (paper). Comparisons of the mean and standard deviation levels of IL-6 in skin wound tissue over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group. 62

Figure 8 (paper): Comparisons of the mean and standard deviation levels of CINC-1 (a homolog of human IL-8) in skin wound tissue over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group…….. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade biológica mediada por MMPs..... 27

Tabela 2. Parâmetros do Laser..... 40

Tabela 3. Primer utilizado no RT- PCR em tempo real (qRT-PCR)..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
InGaAIP	Fosfeto Indio-Gálio-Alumínio
iNOS	Síntese induzível de óxido nítrico
J	Joule
LBP	Laserterapia de baixa potência
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
MMPs	Metaloproteinases
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mW	Milliwatts
nm	Nanômetro
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TIMP	Inibidor de tecido das metaloproteinases
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
W	Watts

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O perfil epidemiológico atual do Brasil é definido como tripla carga de doenças, ou seja, marcado pela coexistência das doenças infecciosas e parasitárias, das doenças e agravos crônicos não transmissíveis e das causas externas. Esses agravos crônicos, como diabetes, doenças cardiovasculares, bem como algumas causas externas, como acidentes de trânsito, podem desenvolver complicações diversas, como as feridas complexas de difícil cicatrização e essas se tornam mais complicadas quando associadas à idade avançada do indivíduo (BRASIL, 2014).

Essas feridas representam um grande problema de saúde pública devido ao impacto sócio-ecônomico que contribui para onerar os cofres públicos com tratamento ambulatorial prolongado, pagamento de benefícios por longo período de tempo e, muitas vezes, aposentadoria precoce. Além disso, gera um enorme impacto na qualidade de vida da pessoa acometida.

Após uma perda tecidual é desencadeado o processo de cicatrização que consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares, envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos que irão interagir entre si para que ocorra a reconstituição do tecido (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000).

Em uma ferida cutânea, a cicatrização depende de vários fatores como: localização anatômica, tipo da pele, raça e idade, onde a cicatrização em uma mesma espécie varia se a ferida ocorre no feto, no recém-nascido, no indivíduo adulto ou no idoso (JÚLIA; et al., 1992).

Diante das mudanças estruturais que ocorrem na pele do indivíduo idoso, a cicatrização de ferimentos torna-se mais lenta devido ao decréscimo da atividade enzimática celular dos fibroblastos e também da diminuição da proliferação celular, que normalmente ocorre com muita intensidade na camada germinativa (GOLDFEDER, 2005; BIONDO-SIMÕES, 2005).

O processo de cicatrização normal é composto por uma sequência de eventos, coordenados por vários tipos de células, incluindo citocinas, quimiocinas, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e plaquetas. A migração, infiltração, proliferação e diferenciação destas células culminará em uma resposta inflamatória, evoluindo para formação de tecido novo e em última análise, o fechamento da ferida. Esse processo complexo é modulado por uma controlada e igualmente

complexa reação celular através de uma rede de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF –α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6); quimiocinas como a interleucina 8 (IL-8), fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros e enzimas (MURPHY, 2006), contudo, o aumento crônico dos níveis desses marcadores inflamatórios, como os fatores de crescimento, as interleucinas e as metaloproteinases (MMPs), alterará a regulação de todo esse processo, podendo levar a uma inflamação crônica, retardando assim, o processo de fechamento da ferida (CHUNG et al., 2009).

A IL-6 é produzida por monócitos e neutrófilos e possui efeitos próinflamatórios, atuando na mitogênese e na proliferação sobre os queratinócitos e é quimioatratante para neutrófilos (GRELLNER; GEORG; WILSKE, 2000). Já a IL-8 é produzida principalmente por macrófagos e tem como funções estimular a migração de vários tipos de células no local da ferida, particularmente as células inflamatórias; contribuir para a reepitelização pelo aumento da migração e proliferação de queratinócitos; induzir a expressão das MMPs pelos leucócitos, e é um forte quimioatraente para os neutrófilos, participando assim da resposta inflamatória (BARRIENTOS et al., 2008). Os ratos não produzem IL-8, mas têm moléculas que são homólogos de GRO humano, a CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) (citocina induzida por quimioatrativo de neutrófilos), que tem um alto grau de homologia com a IL-8 (ZAGORSKI; DeLARCO, 1993).

A angiogênese é considerada um evento de fundamental importância no processo de reparo, pois formará novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes para suprirem de nutrientes e oxigênio o tecido em crescimento. Ela é estimulada principalmente por citocinas angiogênicas, das quais se destaca o VEGF, o qual desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico (SOYBIR et al., 2012).

As MMPs também desempenham papel importante em todos os estágios da cicatrização, degradando todos os componentes da matriz extracelular (MEC) e apresentam habilidade para sintetizar colágeno e outros membros da MEC, contribuindo para a remodelação da ferida. Entretanto, quando não devidamente controladas, ou seja, quando não são inibidas, estão envolvidas no aparecimento de algumas doenças e no atraso do processo de reparo tecidual (ARAÚJO et al., 2011).

A atividade das MMPs é controlada, principalmente, através de inibidores proteicos teciduais denominados inibidores tecidual de metaloproteinases (TIMPs), onde ambos, agindo conjuntamente determinam a arquitetura da MEC (CHEN et al., 2007).

Na cicatrização normal, todas as MMPs podem ser inibidas pelos TIMPs, entretanto, em feridas crônicas, as MMPs não estão devidamente reguladas e a elevação da expressão de MMPs no local e período de tempo errados pode levar a uma ampla degradação da MEC (LOBMANN et al., 2002).

As MMPs conjuntamente, são capazes de degradar todas as proteínas da MEC, envolvendo colágeno, fibronectina, laminina, entre outros, no entanto, em níveis elevados podem também degradar os fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), VEGF, e consequentemente há diminuição ou ausência da proliferação de células imprescindíveis para a substituição tecidual, dentre elas os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. (BUCALO; EAGLSTEIN; FALANGA, 1993).

Várias são as MMPs, porém neste estudo, dar-se-á maior visibilidade à MMP-3 e à MMP-9.

A MMP-9 é uma metaloproteinase, secretada predominantemente por leucócitos, mas também por queratinócitos, e tem função de clivar os colágenos tipo IV, V, VII e X, elastina, membrana basal e colágeno desnaturado, sendo assim um elemento essencial na inflamação e reparação de tecidos. É expressada principalmente na fase inflamatória, mas pode persistir em fases avançadas, sendo secretada pelos queratinócitos (SALO et al., 1994; ARUMUGAM et al., 1999).

Para Ladwig et al. (2002), níveis elevados de MMP-9 diminuem a velocidade do fechamento da ferida e para Bellayr et al. (2009), a redução na atividade da MMP-9 pode contribuir para o acúmulo excessivo de constituintes da matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose.

A MMP-3 é produzida na parede do vaso por fibroblastos, células musculares lisas e macrófagos e tem função de degradar uma ampla gama de proteínas de matriz extracelular e ativar outras MMPs, o que a faz ter um papel chave na degradação da matriz extracelular e remodelação (NAGASSE; WOESSNER, 1999). Porém, quando são superexpressadas, podem alterar a estrutura da parede do vaso por meio da degradação de proteínas da matriz extracelular (BORGHAEI; SULLIVAN; MOCHAN, 1999).

Em feridas crônicas, as MMPs, em especial a MMP-9 estão em nível elevado, o que contribui para o atraso no fechamento da ferida (ASCHCROFT et al., 1997). Cullen et al. (2002), verificaram que os níveis de MMPs estão muito altos em úlceras de pressão e altos em úlceras diabéticas e Aparecida da Silva et al. (2013) verificaram que os níveis de MMP também estão elevados em feridas em ratos diabéticos.

A cicatrização prejudicada no idoso está associada com proteólise e degradação de constituintes da matriz devido ao excesso de inflamação, leucócitos e níveis de MMPs. A taxa de proliferação de fibroblastos diminui, diminuindo a taxa e qualidade da produção de colágeno; a contração da ferida e a reepitelização ocorrem em taxas mais lentas; a deposição de tecido conjuntivo é atenuada e a resistência à tração da ferida é diminuída (WORLEY, 2006; ASCROFT; MILLS; ASHWORTH, 2002).

Os fibroblastos são o principal tipo de célula na derme e desempenham um papel fundamental no processo normal de cicatrização de feridas, no entanto, com o envelhecimento, há uma atrofia geral da matriz extracelular e redução no número de fibroblastos (OPLANDER et al. 2011).

Com a diminuição dos fibroblastos há também diminuição da produção do colágeno, pois este é produzido especialmente pelos fibroblastos. Sua função principal é a de atuar como um andaime no tecido conjuntivo, especialmente nas suas formas tipo I, II e III. Na cicatrização inicial de feridas o tipo III está presente em primeiro lugar e com a progressão e remodelamento da cicatriz há aumento da produção do tipo I (RANGARAJ; HARDING; LEAPER, 2011).

De acordo com Goldfeder (2005), com o envelhecimento, o colágeno, além de mudanças quantitativas, apresenta também mudanças qualitativas que se refletem na diminuição da solubilidade e na alteração de propriedades físicas da molécula.

Tendo em vista que a idade avançada está relacionada ao retardo do processo de cicatrização, a prevenção das complicações continua sendo a parte fundamental no cuidado com as feridas, no entanto, se as medidas preventivas forem insuficientes, os procedimentos terapêuticos, como pomadas, curativos e tecnologias auxiliares são essenciais para promover a reparação de feridas cutâneas, objetivando reduzir o período de cicatrização, bem como promover melhora no tipo de cicatrização, levando o indivíduo a um retorno mais rápido de suas atividades.

Tratamentos utilizando o laser de baixa potência (LBP), têm como finalidade acelerar, incrementar e modular a cicatrização de feridas por meio da diminuição do processo inflamatório induzindo nos tecidos a diminuição do processo inflamatório

(PEREIRA; 2005; ROCHKIND, et al.,1989), redução do edema (KARU, 2006; ALBERTINI et al. 2007) estímulo da síntese de colágeno (SILVA; 2006; FIORIO et al., 2014), aumento da neovascularização (ROCHA JUNIOR et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009), efeitos anti-oxidantes, efeitos bactericidas (AVNI et al., 2005), diminuição do tempo de reepitelização da lesão, redução da dor e melhor qualidade da cicatrização (FIORIO et al., 2014).

Nesse sentido, a proposta da utilização da laserterapia em ratos idosos neste estudo, pretende verificar o comportamento do processo cicatricial no idoso o que contribuirá para subsidiar os profissionais de saúde na utilização desta tecnologia para cicatrização tecidual, aumentando o arsenal de procedimentos e protocolos assistenciais na perspectiva de ampliar a capacidade de resposta a este problema de saúde pública que acomete um grande número de indivíduos.

1.1 Reparo tecidual

O reparo tecidual é um processo dinâmico que inclui vários níveis de organização sequencial e funcional, envolvendo a interação entre células e sistemas mensageiros. Esse processo compreende três fases que se sobrepõe, compreendendo a fase inflamatória, a proliferativa e a de remodelação, como mostra a figura 1

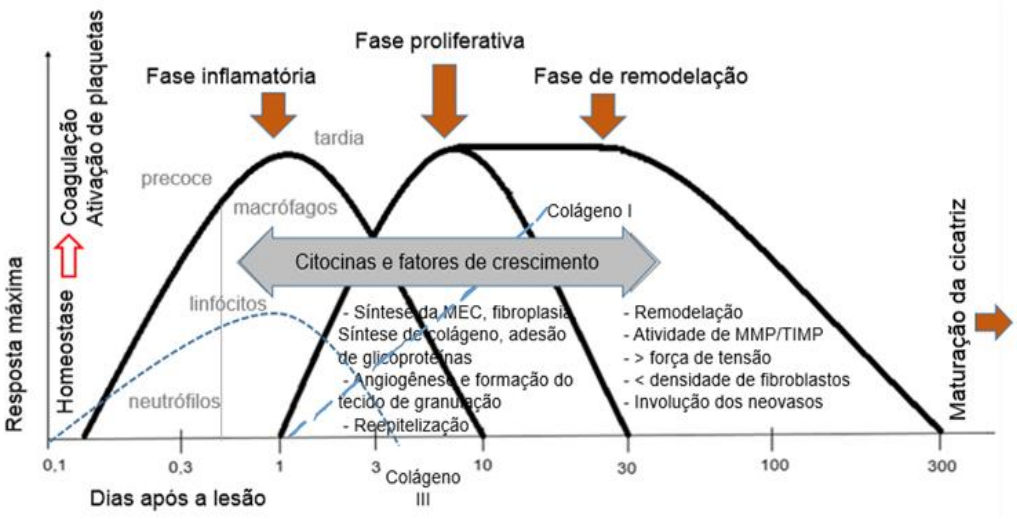


Figura 1: Representação esquemática das fases da cicatrização normal com especificidade celular.
Fonte: Adaptada de Witte; Barbul, (1997) e Isaac el al., (2010)

1.1.1 Fase Inflamatória

Após a ocorrência do ferimento inicia-se o extravasamento sanguíneo e, com a migração de elementos celulares forma-se o coágulo sanguíneo na superfície da ferida, que contém plaquetas, fibrina, fibronectina e componentes do sistema complemento. Este coágulo detém o sangramento e serve de reservatório de citocinas e fatores de crescimento que são fundamentais para iniciar o processo de cicatrização, proporcionando estímulos quimiotáticos para recrutar células inflamatórias circulantes para o local da lesão, iniciando a reepitelização e contração do tecido conjuntivo, e angiogênese (WERNER; GROSE, 2003).

As plaquetas, essenciais à formação do coágulo, sofrem degranulação induzida pela trombina, liberando vários fatores de crescimento que têm como função estimular ou inibir a síntese de determinadas proteínas, além de atuarem na ativação e migração de células. Os fatores de crescimento secretados pelas plaquetas por degranulação que se destacam são o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF-β (fator transformador do crescimento beta) que em primeiro momento terão como função atrair neutrófilos e monócitos, e o EGF (fator de crescimento epidérmico) que será mais ativo na fase proliferativa (GUYURON et al., 2009).

Os macrófagos, fibroblastos e células endoteliais da região agredida determinam o início da reação de fase aguda da inflamação. Estas células liberam mediadores, especialmente as citocinas e quimiocinas, que desencadeiam uma resposta no organismo para modular a coagulação sanguínea, a fibrinólise e a função das células do sistema imune, além disso, são fundamentais para o processo de cicatrização, contribuindo para o recrutamento dos subtipos de leucócitos, regulação da epitelização, remodelamento tecidual e angioênese (GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Os principais mediadores do processo inflamatório são a interleucina-1, interleucina-6 e o TNF-α. A IL-1 e o TNF-α são conhecidos como citocinas pró-inflamatórias, pois induzirem a expressão de outras citocinas, como a IL-2, e de mediadores que promovem a inflamação (BILATE, 2007).

A IL-1 é produzida por neutrófilos, monócitos, macrófagos e sua função é aumentar a migração e proliferação de queratinocitos (RAJA et al., 2007).

O TNF-α é importante no equilibrio dos sinais pró-inflamatórias controlando a cicatrização de feridas. Expresso em níveis baixos, o TNF-α estimulam a inflamação e aumentam a síntese de macrófagos e fatores de crescimento, promovendo indiretamente

a cicatrização de feridas, contudo quando expressado em níveis altos o TNF-α tem um efeito prejudicial sobre a cicatrização, pois suprime a síntese de proteínas da MEC e seus inibidores teciduais, aumentando a síntese de MMPs (BARRIENTOS; et al., 2008).

A IL-6 é produzida por monócitos e neutrófilos e possui efeitos próinflamatórios sinérgicos com a IL-1 e o TNF-α, porém não induz a produção de citocinas (GABAY; KUSHNER, 1999); também possui efeitos antiinflamatórios ao exercer controle parcial sobre a produção de IL-1 e TNF-α (O'MALLEY; MOLDAWER, 2006), tem efeito mitogênico e de proliferação sobre os queratinócitos e é quimioatratante para neutrófilos (GRELLNER; GEORG; WILSKE, 2000).

A IL-8 é produzida principalmente por macrófagos e em menor quantidade por fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos e condrócitos e tem como função estimular a migração de vários tipos de células no local da ferida; particularmente as células inflamatórias. A expressão de IL-8 é aumentada em feridas agudas e, contribuem para a reepitelização pelo aumento da migração e proliferação de queratinócitos; também induz a expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) pelos leucócitos, e é um forte quimioatraente para os neutrófilos, participando assim da resposta inflamatória (BARRIENTOS et al., 2008).

Em resumo, os mediadores químicos desempenham um papel crucial na iniciação e manutenção da resposta inflamatória, atuando na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, ativação de leucócitos, na proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e na angiogênese, preparando assim o tecido para a continuidade do processo de reparo

1.1.2 Fase Proliferativa

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito, se inicia ao redor do 4º dia após a lesão por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo TGF-α e EGF e se estende aproximadamente até o término da segunda semana. É constituída por três etapas fundamentais: epitelização, angiogênese e fibroplasia.

Epitelização: O processo de epitelização permite reconstituir a integridade da permeabilidade da epiderme após a lesão inicial e resulta da migração e diferenciação dos queratinócitos, que são estimuladas pelos factores de crescimento EGF, TGF-α e

fator de crescimento dos queratinócitos (KGF); diferenciação do neo-epitélio e reestruturação da membrana basal (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A migração dos queratinócitos ocorre nas primeiras 24 horas após a lesão cutânea inicial a partir dos bordos da ferida, nos casos de feridas de espessura total e parcial e, a partir de apêndices cutâneos nos casos de feridas de espessura parcial. Alguns fatores contribuem para a migração dos queratinócitos como os receptores das integrinas presentes na superfície dos queratinócitos que permitem a comunicação com a fibronectina da MEC; as MMPs produzidas pelos queratinócitos em migração, nomeadamente a MMP-9, que degrada a ligação ao colágeno tipo IV e laminina da membrana basal e a MMP-1 que permite a interrupção da ligação às fibrilhas de colágeno; e a MEC provisória formada por fibrina, fibronectina e colágeno tipo V (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999; NAGASE; WOESSNER, 1999).

Já a proliferação dos queratinócitos inicia-se geralmente 1 a 2 dias após a lesão inicial e permite o suprimento de células para a migração e formação do novo epitélio, seguindo então a reestruturação da membrana basal que ocorre cerca de 7 a 9 dias após o início da reepitelização, devolvendo a adesão aos queratinócitos da base e estabilização da derme (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

Angiogênese: A angiogênese é estimulada pelo fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007) e representa o crescimento de novos vasos a partir da proliferação de vasos pré-existentes adjacentes ao bordo da ferida. Esses novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Fibroplasia: Esta fase inclui a síntese de colágeno e de outras proteínas da MEC, envolvendo a migração e proliferação dos fibroblastos. A migração dos fibroblastos para o local da lesão é orientada por quimiocinas, TNF-α, PDGF, TGE-β e FGF. Sua subsequente proliferação é desencadeada por vários fatores de crescimento, incluindo, PDGF, EGF, TGF-β, FGF e as citocinas IL-1 e TNF-α, esses fatores de crescimento têm como fonte secretora os macrófagos, mas também outras células inflamatórias e a plaquetas também os secretam (ROBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

Nas primeiras 24 a 72 horas do processo de reparo há proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares, que são as principais células da fase proliferativa, formando o tecido de granulação caracterizado histologicamente pela presença de novos e pequenos vasos sanguíneos e proliferação de fibroblastos. Os

fibroblastos dos tecidos vizinhos são ativados pelo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e migram para a ferida. Em seguida é liberado o TGF-β, que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Por volta de 5 a 7 dias, o tecido de granulação preenche a área da ferida e a neovascularização atinge seu ponto máximo.

1.1.3 Fase de maturação ou remodelamento

A fase de maturação é a fase marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, que se transforma de provisória em definitiva, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. A característica mais importante desta fase é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). As fibras de colágeno tipo III começam a ser produzidas cerca de 48 a 72 horas após a lesão, com secreção máxima após 5 a 7 dias e um máximo acumulado após 2 a 3 semanas. Com o tempo, o colágeno tipo III é reabsorvido e substituído pelo colágeno tipo I, que é mais espesso e organizado ao longo das linhas de tensão, conferindo mais resistência tênsil para a ferida ((BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização, a qual tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, resultando no remodelamento da trama de tecido conjuntivo. Este equilíbrio resulta da atividade combinada de MMPs e de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (VISSIE; NAGASE, 2003).

1.2 Importância do colágeno

O colágeno é uma proteína de grande importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, perfazendo de 25% a 30% do total de proteínas do corpo humano, e têm papel fundamental na arquitetura tecidual, está organizado em fibras insolúveis de grande força tênsil o que lhe confere o papel de principal componente tensor dos tecidos conjuntivos como osso, dentes, cartilagens, tendões e as matrizes fibrosas da pele e vasos sanguíneos. As fibras colágenas começam a se desenvolver durante o período embrionário no processo inicial de diferenciação dos

tecidos e posteriormente são responsáveis pela integridade dos mesmos (VELASCO et al., 2004).

Uma das principais funções do colágeno é a de manter a estrutura física de uma espécie, pois sua estrutura macromolecular lhe confere grande resistência mecânica, resultando na formação de fibras.

No tecido conjuntivo denso não modelado, que é encontrado na derme e em cápsulas envoltórias de vários órgãos, os feixes de fibras colágenas estão distribuídas de maneira difusa, ou seja, não ordenada e entrelaçadas para conferir a estes tecidos resistência e elasticidade, tornando-os resistentes a trações em várias direções. Já no tecido conjuntivo denso modelado, encontrado nos tendões e ligamentos, os feixes de fibras colágenas estão organizados paralelamente entre si, para dar grande resistência e pouca elasticidade ao tecido, conferindo resistência a trações em uma só direção (ROBERTS et al., 2004).

Os fibroblastos, que são as células mais numerosas no tecido conjuntivo frouxo, têm como umas das funções sintetizar o colágeno. A obtenção de colágeno pelos fibroblastos dermais consiste na síntese de cadeias polipeptídicas individuais de colágeno tipo I e III conhecidas como moléculas precursoras chamadas procolágeno. Após a secreção dessas moléculas precursoras para o meio extracelular, seus fragmentos terminais são clivados por meio de enzimas extracelulares, as colagenases e com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno que se polimerizam para formar fibrilas, que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas (ROBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

São conhecidos atualmente 27 tipos diferentes de colágenos, compostos de três cadeias que formam um trímero na forma de tripla hélice, classificados em colágenos fibrilares, os tipo I, II, III, V, IX; colágenos da membrana basal, o tipo IV e outros colágenos os tipos VI, VII, IX, XV, XVII e XVIII, que se diferenciam quanto ao diâmetro, composição aminoacídica, comprimento, estrutura molecular, concentração e localização nos diversos tecidos (ROBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

A proporção do tipo de colágeno existente em um tecido depende da especificidade deste e o tamanho das fibrilas de colágeno é um fator importante para determinar a natureza física do tecido (HARRIS, 2005). Particularmente, na matriz dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: tipo I e tipo III, correspondendo respectivamente a cerca de 80-85% e 15-20% do total desta proteína.

O colágeno do tipo I é o mais abundante no corpo humano, sendo o principal componente estrutural da MEC e responsável pela manutenção da estrutura da derme. É primeiramente sintetizado pelos fibroblastos como um precursor solúvel, procolágeno tipo I, o qual é secretado pelos fibroblastos e sofre ação proteolítica a partir da ação do TGF- β, para formar as fibras insolúveis de colágeno, sendo estas, fibras mais fortes, grossas, densamente agrupadas, e tem diâmetro variável (de 1 a 20μm), está localizado principalmente na derme reticular, a mais profunda da pele e se caracterizam por sua resistência a tração, já o colágeno tipo III apresenta diâmetro de 0,5 a 2 μm e está presente, em sua maioria, na derme papilar, localizada mais superficialmente (SHIN et al., 2005; JUNG et al., 2007).

Na pele, segundo Harris (2005), os principais colágenos existes são:

Colágeno tipo I: é o mais frequente, sintetizado pelos fibroblastos, predomina na derme, ossos e cartilagens, estão presentes nas fibras mais espessas e em termos estruturais é o mais importante para a derme;

Colágeno tipo III: também chamado de "reticulina", está presente em grande quantidade na derme, principalmente ao redor dos nervos e vasos sanguíneos;

Colágeno tipo IV e VII: estão situados, principalmente, na membrana basal e possui como principal função manter a integridade desta membrana de forma a garantir a sua funcionalidade e a adequada nutrição das células da camada basal da epiderme.

No processo de reparação das feridas o colágeno é de fundamental importância na união das bordas, sendo o principal responsável pela resistência mecânica da cicatriz (JUNG et al., 2007).

A degradação do colágeno se inicia precocemente, sendo muito ativa durante o processo inflamatório. Esse processo de degradação é mediado por colagenases específicas, incluindo as colagenases séricas (elastase, catepsina C e proteinase neutra) e as metaloproteinases e a atividade das colagenases é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos..

Ao mesmo tempo em que ocorre a degradação de colágeno I (mais abundante na pele sã), ocorre também a síntese de colágeno III e este processo é estimulado pelo PDGF, contudo, concomitantemente, ocorre a secreção de TGF-β que induz maior secreção do colágeno I e sua menor degradação por aumento da expressão de TIMPs (inibidores de metaloproteinases) e menor da de MMPs, sendo a remodelagem e a contração da ferida parcialmente controladas pela relação entre eles. Esse equilíbrio entre degradação e secreção das células existentes na pele, resultará em uma nova

matriz extracelular (JUNG et al., 2007; BROUGHTON; 2006; SINGER; CLARK; 1999).

Na ferida há, ao contrário da derme íntegra há uma maior proporção de colágeno III em relação ao tipo I. A derme sã contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20% de colágeno tipo III, já o tecido de granulação expressa 30 a 40% de colágeno do tipo III, sendo considerado colágeno imaturo. Com o avançar do processo de cicatrização, principalmente na fase de remodelação há mudança do tipo e da disposição de colágeno que compõe a derme (BROUGHTON, 2006).

Com o tempo, o colágeno tipo III, mais abundante no início do processo de reparo que o tipo I, vai sendo degradado, enquanto que o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos. Paralelamente à substituição do tipo de colágeno, ocorre alteração da organização deste, a qual muda de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de estresse, o que dará maior resistência ao tecido (BROUGHTON, 2006; SINGER; CLARK, 1999).

Essa resistência do leito danificado inicia na última fase do processo de cicatrização. Ao final da primeira semana após o surgimento da ferida, ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra; no final da terceira semana a resistência já passa a 30%, e em três meses a 80%. Isto ocorre porque há uma diminuição da deposição de colágeno, do número de ligações cruzadas feitas entre monômeros desta substância e da mudança do tipo III para o I. Após um ano ou mais ao surgimento da ferida, a relação entre o colágeno I e III atinge proporção semelhante a antes da ferida, no entanto, o local da ferida nunca atingirá 100% de sua resistência fisiológica. (LI; CHEN; KISNER, 2007; BROUGHTON; 2006).

1.3 Cicatrização no idoso

O envelhecimento é um processo biológico complexo, contínuo que se caracteriza por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando à senescência e morte celular programada (apoptose). De acordo com Kede e Sabatovich (2004), esse processo é influenciado por fatores intrínsecos, que estão relacionados a senescência genética e a fatores extrinsecos, ligados a fatores ambientais.

Resende, Bachion e Araújo (2006) afirmam que com o avançar da idade a pele tem alterados seus fatores imunológicos; turgor; metabolismo; sensibilidade, que encontra-se diminuída; estado nutricional, entre outros, que desencadeiam no idoso uma menor resistência às infecções e diminuição da imunocompetência tissular contribuindo para o aparecimento de lesões na pele com tempo de reparação tissular retardado.

De acordo com Makrantonaky e Zouboulis (2008), a pele do idoso apresenta alteração nas três camadas. A epiderme apresenta diminuição da espessura, retificação dos cones papilares, diminuição da coesão intercelular, diminuição da quantidade e função dos queratinócitos e das células de Langerhans, que são células de defesa; na derme, encontra-se redução na proliferação e motilidade dos fibroblastos, da espessura das fibras colágenas e reticulares, redução no número de mastócitos, glândulas sebáceas e sudoríparas com alteração de estrutura e função e diminuição dos órgãos sensitivos terminais; e a hipoderme apresenta-se com menos adipócitos e estes com tamanho reduzido.

Ainda há perda do leito vascular, o que torna a pele pálida com diminuição da temperatura e na hipoderme, observa-se dilatação e espessamento dos vasos o que faz com que a capacidade metabólica dos adipócitos seja alterada (BAILEY, 2001).

Wulf et al., (2004) acrescentam que na pele envelhecida acontece displasia epidérmica com perda de polaridade queratinocítica, infiltrado inflamatório, degradação e desordenamento das fibras elásticas e diminuição do colágeno.

Além da diminuição do colágeno decorrente do desequilíbrio de sua produção e degradação, a qualidade do colágeno restante também é alterada, com diminuição e desorganização dos feixes de fibras, o que leva a uma pele com menos resistência (SGONC; GRUBER, 2013).

Todas essas alterações que acontecem na pele do idoso, refletem um impacto negativo em todas as fases da cicatrização de feridas, que segundo Sgong e Gruber (2013), pode correr um atraso de 20 a 60% no tempo de reparo.

Com o aumento da idade, a fase inflamatória é caracterizada pelo aumento da adesão das plaquetas ao endotélio lesado e aumento da liberação de PDGF, TGFα e TGFβ (ASHCROFT; MILLS; ASHWORTH, 2002), com isso há modificação do infiltrado celular, com aumento da resposta de neutrófilos no início do processo e retardo no influxo de monócitos, com aumento do número de macrófagos maduros, podendo assim, afetar precocemente a resposta inflamatória na cicatrização de feridas (ASHCROFT; HORAN; FERGUSON, 1998)

Os macrófagos são cruciais para o sucesso da cicatrização de feridas, pois participam da síntese de diversos marcadores biológicos essenciais e controlam a formação do tecido de granulação, angiogênese e epitelização, e, de acordo com Mirza, Dipietro e Koh (2009), a redução seletiva dos macrófagos, pode atrasar o fechamento da ferida, com formação diminuída do tecido de granulação, diminuição da angiogênese, da síntese de fator de crescimento e colágeno e esta redução dos macrófagos, com consequente diminuição da atividade fagocítica, foi observada em feridas de animais idosos (SWIFT et al., 2001).

As citocinas, em níveis ideais são importantes mediadores pró-inflamatórios, contudo estudos documentaram aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-10, TNF-α e IL -8 em indivíduos idosos, que pode estar relacionado a um estado pró-inflamatório crônico inerente ao processo de envelhecimento, manifestando-se como um aumento em até quatro vezes nos níveis circulantes de citocinas inflamatórias. (MAGGIO et al., 2006; SANSONI et al., 2008; SARKAR, FISHER, 2006; RAMBO et al, 2013; VASTO et al. 2007).

O desequilíbrio na produção e na liberação de citocinas e a manutenção de um estado pró-inflamatório contribuem para o atraso no processo de reparo tecidual.

A fase de proliferação em feridas de idosos é caracterizada por diminuição e migração de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, associada à redução da resposta aos fatores de crescimento e diminuição da síntese de citocinas, o que leva a diminuição da formação de tecido de granulação, angiogênese e deposição da MEC, resultando no atraso do fechamento da ferida (ASHCROFT; MILLS; ASHWORTH, 2002).

Na fase de remodelação os mesmos autores encontraram um desequilíbrio entre as metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores, os TIMPs, com aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 e diminuição de TIMP-1 e TIMP-2 acarretando em maior atividade proteolítica com degradação de colágeno e outras proteínas da MEC.

1.4 Metaloproteinases (MMPs)

A degradação da MEC, sob condições fisiológicas normais, é um fator importante para o desenvolvimento, morfogênese, reparo e remodelamento tecidual, no entanto, quando este processo acontece de maneira desorganizada, torna-se a causa de muios processos patológicos como artrites, aterosclerose, câncer, fibrose, úlceras

crônicas, etc. Vários tipos de proteínas medeiam esta degradação, mas as principais enzimas envolvidas no processo são as metaloproteinases (MMPs), também chamadas de matrixinas (VISSE; NASAGE, 2003), que além da degradação da MEC, têm função de processar, ativar ou inativar os componentes da MEC, facilitar a migração e diferenciação celular, participar nos processos de reparo, neovascularização, apoptose e em condições patológicas, como invasão tumoral (NAGASE, VISSE, MURPHY, 2006; RANDALL; HALL, 2004).

As MMPs são uma família de endopeptidases extracelulares, secretadas como pró-enzimas por neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos. Nesta família pertencem cerca de 25 proteínas que são divididas em: colagenases intersticiais, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs, que são classificadas de acordo com a especificidade ao substrato e sua estrutura (YAN; BOYD, 2007; VISSE; NASSAGE, 2003).

As colagenases têm capacidade de degradar a tripla hélice dos colágenos intersticiais como os tipos I, II e III. Pertencem a este grupo a MMP-1 (expressa em células endoteliais e células musculares) a MMP-8 (encontrada nos grânulos dos neutrófilos) e a MMP-13. As colágenases estão distribuídas nos tecidos mesmo quando não há indício de degradação da matriz, contudo sua expressão diminui progressivamente nos processos de fibrose evolutiva, indicando sua importância no equilíbrio entre síntese e degradação (VISSE; NASSAGE, 2003).

As gelatinases atuam em fragmentos já degradados pelas colagenases bem como sobre o colágeno tipo IV e elastina. Estão nesta família a MMP-2, que é expressa em células vasculares, e a MMP-9, que é expressa em macrófagos, polimorfonucleares e células vasculares (NAGASE, VISSE, MURPHY, 2006).

As estromelisinas são enzimas derivadas de células estromais que hidrolizam a MEC e podem ser expressas em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, condrócitos e células musculares lisas vasculares. Esta família degrada proteoglicanos como o agrecano, proteínas de ligação, fibronectina, laminina e os colágenos tipo III e IV. . Fazem parte desta família a MMP-3 (estromelisina 1) e MMP-9 (estromelisina 2), que tem especificidade de substrato semelhante, no entanto a MMP-3 apresenta maior eficácia proteolítica e também tem a capacidade de ativar outras MMPs que se ainda se encontram inativas (NAGASE, VISSE, MURPHY, 2006).

As matrilisinas que envolvem a MMP-7 e MMP-26 degradam versican, elastina, fibronectina, colágeno tipo IV entre outros. A MMP-7 é expressa em células epiteliais

glandulares, monócitos e células da parede vascular, já a MMP-26 é sintetizada durante a diferenciação do macrófago (VISSE; NASSAGE, 2003).

As MMPs de membrana estão envolvidas na degradação de colágenos do tipo I, II e III, e são capazes de ativar algumas outras MMPs da matriz. Pertencem a este grupo as MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25 sendo expressas em células do cerebelo, leucócitos do sangue periférico e células tumorais. Estas MMPs não tem ação na parede vascular (NAGASE, VISSE, MURPHY, 2006).

A tabela 1 apresenta as atividades da MMP-3 e da MMP-9 já estudadas, seus respectivos efeitos biológicos e o substrato que clivam.

Tabela 1: Atividades biológicas mediadas pela MMP-3 e MMP-9.

MMPs	**Efeitos biológicos**	**Substrato clivado**
MMP-3	Migração celular	Fibronectina
MMP-3	Geração de fragmento de angiostatina	Plasminogênio
MMP-9		Plasminogênio
MMP-3 e 9	Afinidade aumentada de colágeno	BM-40
MMP-3	Liberação de FGF-β	Perlecan
MMP-3	Aumento da bioaviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGBP-3
MMP-9	Migração de células epiteliais	Laminina cadeia 5γ2
MMP-3 e 9	Pró-inflamatórias	IL-1β a partir do precursor
MMP-9	Resistência das células tumorais	ICAM-I
MMP-3	Antiinflamatório	Monócitos quioatratentes proteína-3
MMP-3	Aumento da bioviabilidade de TGF-β	Decorin
MMP-3	Agredação de células rompidas e aumento da invasão celular	E-calderin
MMP-9	Redução da resposta da IL-2	IL-2Rα
MMP-9	Bioviabilidade de TGFβ	Precursor de TGFβ

Tabela adaptada de Nagase, Visse e Murphy (2006);

Nos tecidos normais e saudáveis, as MMPs não são expressadas em níveis detectáveis, no entanto, em qualquer tecido inflamado, elas são sintetizadas conforme a necessidade, considerando que todo tecido possui matriz extracelular e necessita das MMPs frente ao processo de remodelação tecidual, seja ele fisiológico ou patológico (BORKAKOTI, 2000).

As MMPs podem ser ativadas por componentes não proteolíticos, proteínas serinas, e também podem ser induzidas ou inibidas por uma série de citocinas e fatores de crescimento como o TNF-α, IL-1, TGF-β, entre outros (BROOKS; OLLIVIER, 2004).

A atividade das MMPs parece ser controlada em três níveis básicos. O primeiro é o nível gênico de controle transcricional, sendo que este processo é mediado por citocinas, como as interleucinas e fatores de crescimento. O segundo é a nível molecular, exigindo elementos para converter a forma pró-enzima na forma ativa, nesse caso, a presença da proteinase suscetível serve como isca na região do peptídeo e permite que as proteinases plasmáticas ou proteases bacterianas oportunistas ativem as pró-MMPs; a clivagem da região da "isca" remove apenas uma parte do pró-peptídeo e a remoção completa é realizada em paralelo pela ação de MMP intermediária ou por outra MMP ativa. O terceiro nível é através de inibidores endógenos, envolvendo as α2-macroglobulina e os inibidores naturais das metaloproteinases (TIMPs), que se ligam à MMP e formam complexos estáveis, biologicamente menos ativos que as MMPs, atuam também sobre as MMPs inativas retardando o processo de ativação, sendo o TIMP o inibidor mais específicos das MMPs (RA; PARKS, 2007).

Os inibidores das MMPs, os TIMPs, desempenham um papel importante na remodelação fisiológica do tecido, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC, já que a alteração na homeostasia entre MMPs e TIMPs podem levar a alterações no processo de remodelação do tecido, podendo levar a cronicidade (NAGASE; WOESSNER, 1999)

Os TIMPs são encontrados no meio extracelular e possuem capacidade de inativarem as MMPs, ligando-se ao sítio ativo destas; além de apresentarem um papel importante no crescimento de diferentes tipos celulares, mudanças na morfologia das células e apoptose (SIVAK; FINI, 2002; VISSE; NASSAGE, 2003).

Variações nos níveis de TIMPs são considerados importantes porque afetam diretamente o nível da atividade de MMPs, tendo sua expressão regulada por vários fatores como as IL-1β, IL-6, o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (BFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral-α, TGF-β, retinóides, ésteres de forbol e glicocorticóides. A função do TIMP é controlada por hormônios e pelos sistemas citocinas, sendo o TIMP-1 aumentado por retinóides, glucocorticóides, IL-1, EGF, TGF-β e TNF-α, enquanto que o TIMP-2 é diminuído pelo TGF-β (VISSE; NAGASE, 2003).

A família dos TIMPs é composta por quatro proteínas multifuncionais denominados TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Os TIMPs inibem todas as MMPs, porém o TIMP-1 é um fraco inibidor para as MMP-2, MMP-14, MMP-16, MMP-24 e

MMP-19, enquanto que o TIMP-2 é um fraco inibidor da MMP-9, além de possuir capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais induzidas pelo fator de crescimento básico fibroblástico e tomar parte na ativação de MMP-2; o TIMP-3 possui ação pró-apoptótica, enquanto que os TIMP-1 e -2 são anti-apoptóticos (VISSE; NAGASE, 2003; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; YOSHIBA et al., 2003).

1.5 Papel das metaloproteinases na cicatrização de feridas

Na cicatrização normal, as MMPs desempenham papéis essenciais em todos as fases do processo cicatricial, degradando todos os componentes da MEC e apresentam habilidade para sintetizar colágeno e outros membros da MEC (ARAÚJO et al., 2011).

Na fase inflamatória da cicatrização, poucas horas após a injúria ocorre o recrutamento de neutrófilos e logo em seguida chegam os linfócitos e macrófagos que possuem em seus grânulos a MMP-9 e com isso essa metaloproteinase é liberada no local da lesão (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

As MMPs nessa fase, decompõem a MEC danificada que ocorre no leito da lesão, permitindo que os novos componentes da MEC como o colágeno, a fibronectina e os proteoglicanos que são sintetizados pelas células das feridas se integrem de maneira adequada aos componentes intactos da MEC nos rebordos das feridas. Ainda nesta fase, as bactérias produzidas na ferida, produzem uma matriz gelatinosa que protege os micróbios do sistema imunitário, contudo as MMPs secretadas pelas células inflamatórias digerem essa matriz gelatinosa, auxiliando na remoção desta (McCAW; EWALD; WERB, 2007; PARKS, 1999). No entanto, quando as feridas agudas são colonizadas por bactérias que em questão de dias se transformam em bactérias de biofilme persistente, prolongando a fase inflamatória, há ativação de células inflamatórias que segregam MMPs na tentativa de destruir as bactérias, porém elas podem destruir também fatores pró-cicatrização e componentes da MEC no leito da ferida, alterando o processo cicatricial (GIBSON et al., 2009)

Uma vez que o local da ferida foi limpo pelos macrófagos e linfócitos, ocorre também um aumento na angiogênese e há migração de fibroblastos para iniciar a fase proliferativa e para a deposição de colágeno para uma nova MEC, formando, assim, o tecido de granulação.

Na fase de proliferação as MMPs degradam a membrana basal ao redor dos capilares, permitindo que as células endoteliais capilares migrem de capilares próximos

à ferida e reconstituam novos vasos sanguíneos no leito da ferida, ainda, as MMPs estimulam a migração de células epiteliais, fibroblastos e células vasculares endoteliais passando pela ou através da MEC (PARKS, 1999). Nesta fase há uma superexpressão de MMP-1, 3 e 9 na borda da ferida (ARAÚJO et al., 2011).

Na fase de remodelação as MMPs tem papel na contração e remodelação da MEC cicatricial. As MMPs secretadas por miofibroblastos são necessárias para a contração cicatricial da nova MEC sintetizada, e mesmo em níveis baixos muito tempo depois da cicatriz inicial estar formada, elas removem lentamente a MEC desorganizada, que gradualmente é substituída por uma MEC mais normal e altamente organizada (McCAW; EWALD; WERB, 2007; PARKS, 1999; ULRICH et al., 2009).

De acordo com Gibson et al., (2009), apesar das MMPs apresentarem grande importância na degradação das proteínas para que novos tecidos se formem, quando elas são superexpressadas por muito tempo e em locais errados, começam a degradar proteínas, que não o seu substrato normal, resultando na destruição de proteínas que são essenciais para a cicatrização, acabando por comprometer o processo cicatricial, levando ao atraso ou formação de cicatriz anormal. As MMPs em níveis elevados nas feridas podem induzir indiretamente a elevação de níveis de elastase, o que irá degradar a elastina, um constituinte principal das fibras de tecido elástico e, elevação dos níveis de plasmina, que digere a fibrina, uma proteína encontrada nos coágulos sanguíneos.

A superexpressão das MMPs pode ser ocasionadas por diversos fatores, dentre eles a diminuição dos níveis de seus inibidores, os TIMPs, o que pode levar a cronicidade das feridas, e pelo excesso de citocinas como o TNF, IL-1 e IL-6. Essas citocinas são liberadas por células inflamatórias ativadas no local da ferida, que, quando em excesso contribuem ainda mais para o processo inflamatório, pois estimulam a produção de níveis elevados anormais de proteases, incluindo as MMPs e de radicais livres, que provocam danos tissulares (LADWIG et al. 2002).

As MMPs em níveis elevados podem também degradar os fatores de crescimento, como o PDGF, EGF, VEGF, e consequentemente há diminuição ou ausência da proliferação de células imprescindíveis para a substituição tecidual, dentre elas os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (BUCALO; EAGLSTEIN; FALANGA, 1993)

A MMP-9 é uma metaloproteinase, secretada predominantemente por leucócitos, e um elemento essencial na inflamação e reparação de tecidos e tem função de clivar os colágenos tipo IV, V, VII e X, elastina, membrana basal e colágeno desnaturado. Tem

seu pico entre 2 e 4 dias após o início da lesão, sendo expressada principalmente na fase inflamatória, contudo os níveis de MMP-9 persistem mesmo depois do fechamento da ferida, sugerindo que esta metaloproteinase provavelmente desempenha um papel importante na remodelação da matriz e possivelmente cicatriz (SALO et al., 1994; ARUMUGAM et al., 1999).

Níveis elevados de MMP-9 diminuem a velocidade do fechamento da ferida, contribuindo para o atraso da cicatrização (LADWIG et al., 2002) e para Bellayr et al., (2009), a diminuição da atividade da MMP-9 pode contribuir para o acúmulo excessivo de constituintes da matriz extracelular, podendo assim, desenvolver fibrose.

Aschcroft et al., (1997) verificaram que a MMP-9 está presente em níveis muito elevados em úlceras, o que pode contribuir para a natureza corrosiva do ambiente da ferida crônica.

Para Sivak e Fini (2002) a MMP-9 também está envolvida no processo de neovascularização. Isto pode ser explicado pela importância e interatividade com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na formação de novos vasos sanguíneos (EBRAHEN et al., 2010).

A MMP-3 ou estromelisina-1 é produzida na parede do vaso por fibroblastos, células musculares lisas e macrófagos. Podem degradar uma ampla gama de proteínas de matriz extracelular e ativar outras MMPs, o que a torna ter um papel chave na degradação da matriz extracelular e remodelação (NAGASSE, 1998).

Young e Grinnell (1994) verificaram que MMP-3 atinge seu nível máximo após o quarto dia, já Arumugam et al., (1999) encontraram que a MMP-3 foi observada apenas no dia 6, o que coincide com o início da contração da ferida.

Quando são superexpressadas podem contribuir para o desenvolvimento de alterações estruturais na parede do vaso por meio da degradação de proteínas da matriz extracelular, como proteoglicanos, laminina, fibronectin e colágenos tipo III, IV, V e IX e também pode potencializar o efeito proteolítico da MMP-9 (BORGHAEI; SULLIVAN; MOCHAN, 1999).

Em resumo, as MMPs são necessárias na quantidade e duração certa e no local indicado para que uma ferida cicatrize, contudo, a sua superexpressão pode determinar a cronicidade de uma ferida, além de terem seus níveis elevados em feridas crônicas, com isso, tratamentos que reduzam a atividade das MMPs, podem promover a cicatrização de feridas que não evoluem. Diante disso, o laser mostra-se ser uma proposta positiva no reparo tecidual.

1.6 Angiogênese

A angiogênese é considerada uma etapa fundamental do processo de reparo, pois novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes que não foram lesionados, para suprirem de nutrientes e oxigênio o tecido em crescimento. Ela ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais (FOLKMAN; SHING, 1992).

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator transformador de crescimento beta (TGF-β) são as principais citocinas angiogênicas na angiogênese de feridas e têm como função ativar as células endoteliais, que iniciam a expressão do ativador de plasminogênio, o qual cliva o plasminogênio sérico em plasmina e a pró-colagenase em colagenase (MMPs) que degrada colágeno (KIERSZENBAUM; 2004).

O VEGF, principal citocina angiogênica é uma proteína extremamente importante na angiogênese e tem sua regulação mediada pela hipóxia tecidual, algumas citocinas como o fator de necrose tumoral (TNFα), o fator de crescimento tumoral α e β (TGF-α e β), fator de crescimento epidermal, interleucinas e fator de crescimento fibroblástico básico.

No início da cicatrização, por volta de 1 dia após a lesão, os queratinócitos presentes na borda da ferida expressam VEGF que atinge seu pico após 2 a 3 dias, mantendo máxima expressão entre 3 e 7 dias após o ferimento, período em que a diferenciação e o crescimento capilar estão no máximo. Essa expressão positiva promove as fases iniciais da angionênese, incluindo a dilatação vascular, a permeabilidade, a migração e a proliferação, no entanto a baixa expressão do níveis de VEGF acarreta em vascularização insuficiente que provavelmente contribui para atrasos no processo de reparação tecidual (JOHNSON; WILGUS, 2014).

1.7 Laser e o reparo tecidual

A palavra laser é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation que significa uma radiação de luz por emissão estimulada de radiação. Teve seu princípio descrito por Albert Einstein em 1916, quando postulou o fenômeno físico da emissão estimulada de fótons de um meio ativo excitado.

Para Genovese (2000) a interação do laser com os tecidos biológicos depende do comprimento de onda, da densidade de energia e da potência do laser. As energias depositadas pelo fóton nos tecidos biológicos podem gerar processos vibracionais, rotacionais e eletrônicos que imediatamente se transforma em outro tipo de energia ou efeito biológico que são chamados de efeitos primários da radiação.

Quando a célula é submetida à irradiação laser observa-se um aumento na produção de ATP, maior atividade da enzima fosfatase alcalina, o que incrementa a proliferação celular, e ainda maior expressão de citocinas (IL-6). Assim, foi sugerido que a irradiação laser tem um efeito terapêutico adicional por estimular a produção citocinas, promovendo a comunicação intercelular, migração e proliferação, para auxiliar no processo de cicatrização tecidual (HAWKING-EVANS; ABRAHAMSE, 2006).

Os lasers vermelhos são mais adequados para o tratamento da pele, visando o reparo tecidual, pois sua pouca profundidade de penetração no tecido, facilita a concentração da luz nas células-alvo da LBP que estão localizadas na epiderme (células estaminais epidérmicas) e nas partes superiores da derme (fibroblastos, macrófagos e células endoteliais).

A terapia com laser de baixa potência (LBP) pode modular a cicatrização de feridas através da indução de um aumento na atividade mitótica, número de fibroblastos, síntese de colágeno e neovascularização (ROCHA JUNIOR et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009, FIÓRIO et al., 2014), reduzindo o período de cicatrização e melhora no tipo de cicatrização (FIORIO et al., 2011, HAWKING-EVANS; ABRAHAMSE, 2006), levando o indivíduo a um retorno mais rápido de suas atividades.

O laser, através de seu efeito biomodulador, afeta positivamente todas as fases do processo de cicatrização (ENWEMEKA et al. 2004; GONÇALVES et al., 2010) como aumento da proliferação e atividade celular, aumento da síntese de DNA, modulação da produção dos fatores de crescimento e redução na produção de prostaglandinas, entre outros.

Tacon et al. (2011) encontrou, na fase inflamatória, diminuição do infiltrado de polimorfonucleares e da hemorragia, além de aumento da angiogênese e da fibroplasia em fases mais adiantadas da cicatrização, utilizando um laser diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo (AlGaInP), com comprimento de onda de 660 nm e densidades de energia de 3J/cm2 e 6J/cm^2.

Rambo e colaboradores (2014), analisaram os efeitos do Laser de baixa potência no processo de reparação tecidual sobre a expressão proteica das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10 e, expressão gênica das citocinas TNF-α e IL-1β em modelo de ferida cutânea em ratos jovens e adultos e verificaram que a laserterapia se mostrou eficaz no tratamento das feridas cutâneas nos animais jovens e idosos, em diferentes fases do processo de reparação tecidual.

De acordo com Hosaka et al., (2005), algumas IL, como a IL-1 e IL-6 e fatores de crescimento estão envolvidas na regulação das MMPs, sendo que o aumento dessas IL induz o aumento das MMPs e com isso há aumento do quadro inflamatório. Com isso, a diminuição dos níveis dessas interleucinas acarretará na diminuição da expresão das MMPs.

As MMPs têm como função a degradação do colágeno e isso acontece em conjunto com a síntese de colágeno por outras células. Gavish, Perez e Gertz (2006), estudando a atividade de MMPs após utilização da terapia laser encontraram uma atividade modulada e expressão de MMP2 e uma regulação na expressão de colagenase (MMP-1) e de inibidores de MMPs (TIMP2) em parceria com o aumento na síntese colágeno.

Gonçalves et al. (2010), obtiveram resultados significativos no fechamento da ferida e concentração do colágeno tipo I com o uso do laser arseneto de gálio- alumínio (GaAlAs) com densidade de energia de 4 J/cm^2.

Busnardo e Simões, (2010) utilizaram laser HeNe (632,8 nm) com energia de 4 J/cm^2 na cicatrização de feridas e observaram aumento de colágeno tipo III, diminuição do infiltrado inflamatório e resolução precoce da fase inflamatória das feridas.

Com o mesmo comprimento de onda, porém com dose de 5 J/cm2, Al-Watban e Andres (2001) obtiveram maior proliferação de mitocôndrias e fibroblastos, bem como da microcirculação, com consequente aumento do metabolismo celular.

Utilizando Laser de HeNe com doses de 3 e 6 J/cm^2 em feridas de coelhos, Inoe et al., (2008) observaram no 14º dia presença de tecido de granulação maduro e no 21º dia ausência de hemorragia e exsudato.

Pode-se perceber que o laser influência positiva no processo de reparo tecidual, seja modulando a fase inflamatória ou acelerando a deposição de fibras colágenas e elásticas, acelerando a cicatrização de feridas.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo avaliar e comparar o efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas em ratos idosos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do LBP na expressão proteica de colágeno tipo I e tipo III;

Analisar os efeitos do LBP sobre a imuno expressão das metaloproteinases (MMP- 3 e MMP-9), TIMP 2 e VEGF.

Analisar os efeitos do LBP sobre a expressão proteica de CINC-1 (homólogo a interleucina 8 - IL-8 em humanos)

Analisar os efeitos do LBP sobre a expressão gênica de interleucina 6 (IL-6).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 45 ratos (norvergicos albinus), de linhagem Wistar, machos, dos quais 15 jovens (± 30 dias) com peso corporal variando de 130 a 150 gramas, e 30 idosos (±500 dias) com peso corporal variando de 400 a 450g, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho e estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aos padrões de experimentação animal do International Council for Laboratory Animal Scienc, sendo aprovado sob o Protocolo nº AN0028.2014

3.2 Grupos experimentais

Os animais (15 jovens e 30 idosos) foram distribuídos de forma aleatória em três grupos experimentais, sendo um número de 05 animais por subgrupo de acordo com os tempos experimentais 3, 7, 14 dias, respectivamente:

G1 controle idoso: Animais idosos submetidos apenas à lesão cutânea;

- G1 (3 dias): 05 animais
- G1 (7 dias): 05 animais
- G1 (14 dias): 05 animais

G2 tratado idoso: Animais idosos submetidos à lesão cutânea e ao tratamento com Laser;

- G2 (3 dias): 05 animais
- G2 (7 dias): 05 animais
- G2 (14 dias): 05 animais

G3 controle jovem: Animais jovens submetidos apenas à lesão cutânea;

- G3 (3 dias): 05 animais

- G3 (7 dias): 05 animais
- G3 (14 dias): 05 animais

A figura 2 representa a composição dos grupos experimentais.

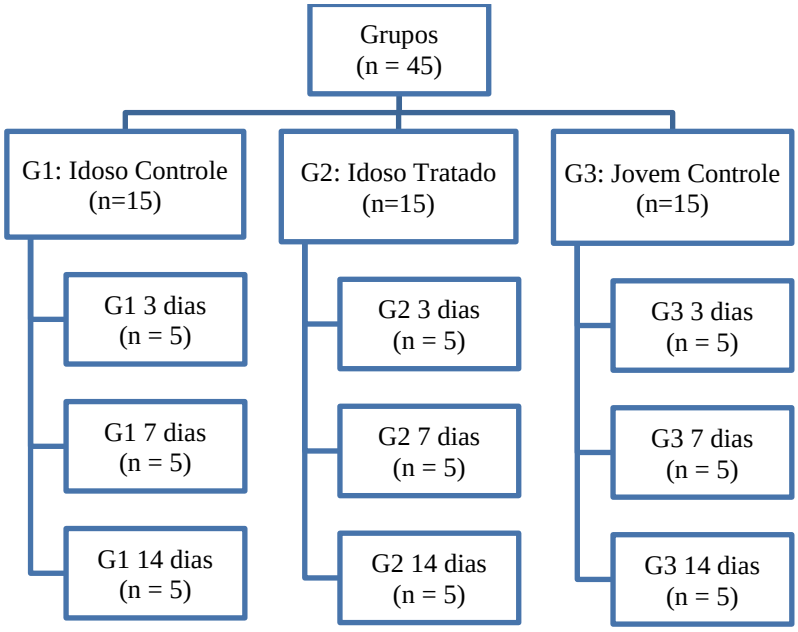


Figura 2. Composição dos grupos experimentais.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Produção das feridas cutâneas

Após a pesagem, os animais foram anestesiados antes de cada lesão cutânea, com uma solução de Ketamina 7% (Cetamin, Syntec, Cotia, SP) e Xilazina 0.3 % (Xilazin, Syntec, Cotia, SP) numa proporção de 2:1 (0.2 ml a cada 100g do animal) por via intraperitoneal. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para esterilização com álcool-iodado e tricotomia na região do dorso do animal. Para realizar a ferida, foi utilizado um "punch" de 8 mm de diâmetro permitindo a remoção de uma área circular da pele. Foram realizadas duas feridas em cada animal, com a localização na porção média do plano sagital mediano. O modelo experimental seguiu o modelo de Rambo et al., (2013).

Após a confecção das feridas os animais foram colocados em gaiolas limpas, sendo cinco em cada uma, com água e ração apropriada à vontade.

Utilizou-se como medicamento analgésico a dipirona sódica por 2 dias após a confecção das feridas cutâneas na dose de 0,1 ml/ animal, de 4/4 horas para evitar que os animais sentissem dor.



Figura 3. Produção das Feridas cutâneas
Fonte: Autor

3.3.2 Aplicação do Laser

Foi utilizado o Laser da marca DMC® modelo Photon Laser III com potência de 30 mW (densidade de potência de 1,07 W/cm2), área do feixe de 0,028cm2, e comprimento de onda de λ 660nm, meio ativo de Fosfeto Indio-Gálio-Alumínio (InGaAlP). A aplicação no experimento em vivo deu-se sob forma de um único ponto pelo método transcutâneo; com energia total de 2 joules por ferida, densidade de energia de 72 J/cm2, tempo de 1min e 07 segundos (Tabela 2). Foi utilizada uma cartolina preta com uma abertura central posicionada na região da ferida para impedir a incidência da luz nas regiões circunvizinhas e certificar que a luz fosse depositada sobre a ferida (Figura 4). A aplicação iniciou após a confecção das lesões cutâneas e em dias alternados no grupo experimental 2 até o dia da eutanásia de cada grupo. Os grupos 1 e 3 não receberam tratamento e foram adotados como grupos-controle comparativo para a análise histológica e imunoistoquímica.

Todos os procedimentos metodológicos referentes à execução dos experimentos foram realizados por um mesmo executor.

Tabela 2. Parâmetros do Laser

Laser da marca DMC® modelo Photon Laser III Meio ativo (InGaAlP)	
Comprimento de onda: nm1	660
Frequência	Contínuo
Densidade de Potência: W/cm^2	1,07
Potência de Saída: mW	30
Área do feixe: cm^2	0,028
Densidade de Energia: J/cm^2	72
Energia Total Entregue: Joules	2
Tempo de irradiação por tratamento: segundos	67

A figura 4 ilustra a aplicação do laser com utilização da cartolina.

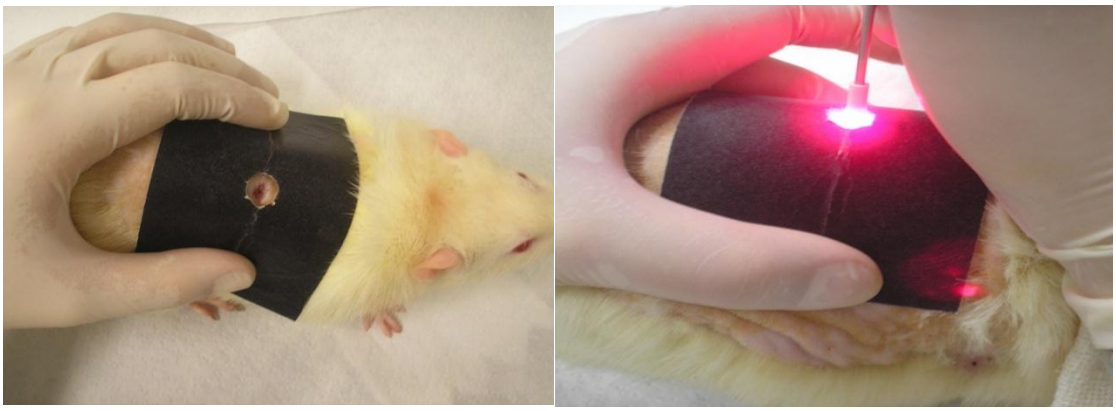


Figura 4. Cartolina preta com uma abertura central, posicionada na região da ferida para impedir a incidência da luz nas regiões circunvizinhas e aplicação do Laser.
Fonte: Autor

3.3.3 Eutanásia

No final de cada período experimental 3, 7 e 14 dias, os animais foram identificados, pesados e posteriormente eutanasiados com o uso de Tiopental Sódico (Cristália Itapira – SP, Brasil) numa dose de 0.05 ml/100g, por via intraperitoneal.

Após a eutanásia, seguindo os tempos indicados, as áreas incisadas foram cirurgicamente removidas com margem de 1cm de pele em torno da lesão com profundidade até a fáscia.

As amostras resultantes (duas de cada animal) foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C e distribuídas, sendo uma para a realização dos procedimentos histológicos e a outra para a análise da expressão proteica por meio do Elisa e expressão gênica por meio do RT-PCR.

3.3.4 Procedimentos Histológicos

As amostras congeladas em nitrogênio líquido foram incluídas em OCT (Tissue Teck® Compound-Sakura® Finetechnical Co) e preparados cortes de 4 µm de espessura em criostato (Leica Modelo CM 1850) e preparadas em lâminas silanizadas para imunoistoquímica.

3.3.5 Imunoistoquímica

As secções congeladas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 0,3% de H2O2 em metanol durante 30 min. As secções foram lavadas em PBS (6 lavagens de 5 min) e montado com 1% de soro normal de cabra em PBS durante 30 min. Posteriormente, as lâminas foram incubadas na presença do anticorpo primário aplicado durante toda a noite a 4°C.

Os anticorpos primários utilizados foram : VEGF: mouse anti-rat VEGF antibody (VG-1; Abcam, Tokyo, Japan), TIMP-2: goat anti-TIMP-2 antibody (sc6835, Santa Cruz Biotechnology, Inc), MMP-3: rabbit anti-MMP-3 antibody (ab-53015, Abcam, Tokyo, Japan), MMP-9: goat anti-MMP-9 antibody (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Collagen I: mouse Antibody (Col-1) (sc-59772, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Collagen III: rabbit Antibody (S-17)-R (sc-8780 R, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após lavagem em PBS (6 vezes, 5 min), foram incubadas com anticorpo secundário, de acordo com o anticorpo primário utilizado por 30 minutos.

Ao término do período de incubação, as lâminas foram lavadas com tampão PBS por 10 minutos e incubadas com anticorpo de ligação conjugado a peroxidase HRP do Kit DakoCytomation LSAB plus System HRP (Dako Corporation, CA, USA) por 30 min. Em seguida foi realizada a detecção com solução cromógena, contendo 0,03% de 3-31-diaminobenzidina em tampão Tris-Hcl 0,05M, pH 7,4 com peróxido de hidrogênio a 0,3% (DAB, Dako). Após a revelação, realizou-se a contra-coloração das lâminas com

solução de hematoxilina de Mayer, durante 10 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em água destilada.

3.3.6 Quantificação da expressão gênica da IL-6

O RNA total foi extraído a partir de amostras de pele da ferida e os ensaios de RT- PCR foram realizados para quantificar a expressão de mRNA, como descrito a seguir. Os tecidos descongeladas foram homogeneizados em Trizol (1 mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) e o RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total (1 µg) foi utilizado para a síntese de DNA complementar e RT-PCR . O DNA contaminante foi inicialmente removido por incubação da amostra durante 15 min a 37°C, usando DNAase I (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) em 1U/µg RNA em 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 contendo 2 mM de $MgCl_2$, seguido por uma incubação a 95°C durante 5 minutos para inativar a enzima. Em seguida, a transcrição reversa (RT) foi realizada num volume de reação de 200 µL na presença de 50 mM de Tris-HCl (pH 8.3) contendo 3 mM $MgCl_2$, 10 mM de ditiotreitol, 0.5 mM de desoxinucleótidos, e 50 ng de primers aleatórios com 200 unidades do Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA). As condições de reação foram de 20°C durante 10 min, 42°C durante 45 min e 95°C durante 5 min.

O produto da reação foi amplificado com o RT-PCR, utilizando o 7500 Sequence Detection System (ABI Prism® Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o SYBR Green Core Reaction Kit (Applied Biosystems). As condições de ciclos térmicos foram: 50ºC durante 2 min, depois 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 15 s e 60°C durante 1 min. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada ponto de tempo. A abundância do mRNA do gene alvo foi quantificado como um valor relativo em comparação com uma referência interna, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), cuja abundância não mudou com as condições experimentais variadas. O primer utilizado para o RT -PCR está descrito na tabela 3.

Tabela 3. Primer utilizado no RT- PCR em tempo real (qRT- PCR)

IL-6: GenBank® accession number E02522, (forward primer: 5′-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3′; reverse primer: 5′-

TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3′

3.3.7 Avaliação dos níveis do mediador inflamatório CINC-1

A dosagem de CINC-1 das amostras foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizados com 100 µl de anticorpo monoclonal para a citocina: anti-CNC-1 diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9.6). As placas foram incubadas a 4ºC por 18h. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (Sigma - St Louis MO USA) - solução PBS contendo 0.05% de Tween® 20 por 4 vezes e depois preenchidas com 300 µL/poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) à 37ºC por 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100µL/poço das amostras devidamente diluídas ou do padrão da citocina recombinante foram adicionados à placa e deixados por 18 h em temperatura de 4ºC. Após lavagem, 100µl dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para a citocina foram acrescentados e deixados por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100µl de estreptavidina–peroxidase foi adicionado e deixado por 1 h em temperatura ambiente (22ºC) seguida de novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço da solução de 3.3’5.5’-tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax® Plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção a 570 nm. As concentrações da citocina nas amostras foram calculadas a partir das curvas padrão obtidas a partir das citocinas recombinantes (MAFRA DE LIMA et al., 2010).

3.3.8 Análise das áreas marcadas pela imunoistoquímica

Cada amostra foi observada em microscópio (Nikon E200) e as imagens foram capturadas por microcomputador equipado com o software IC Capture 2.2.

Para a quantificação das áreas representativas das fibras colágenas, da MMP-3, da MMP-9, do TIMP-2 e VEGF, foram digitalizados quatro campos com objetiva de 10x acoplado a uma câmara para captura de imagem, conectada ao microcomputador

equipado com placa de vídeo.

Antes do processo de quantificação, todas as imagens foram digitalizadas padronizando-se a intensidade de luz do microscópio e a altura do condensador.

Para cada imagem quantificada, utilizou-se o mesmo intervalo de cor, para separar a área a ser quantificada. O intervalo de cor padronizado foi definido de forma empírica, no momento inicial do experimento. Através de tentativa e erro, uma faixa de cor foi ajustada até separar as áreas representativas na imagem.

Uma vez capturadas, a análise das lâminas foi realizada através da digitalização de imagens, por meio de um microcomputador com programa específico de processamento e análise de imagem “Image - Pro Plus ® 4.5” (Figura 5).

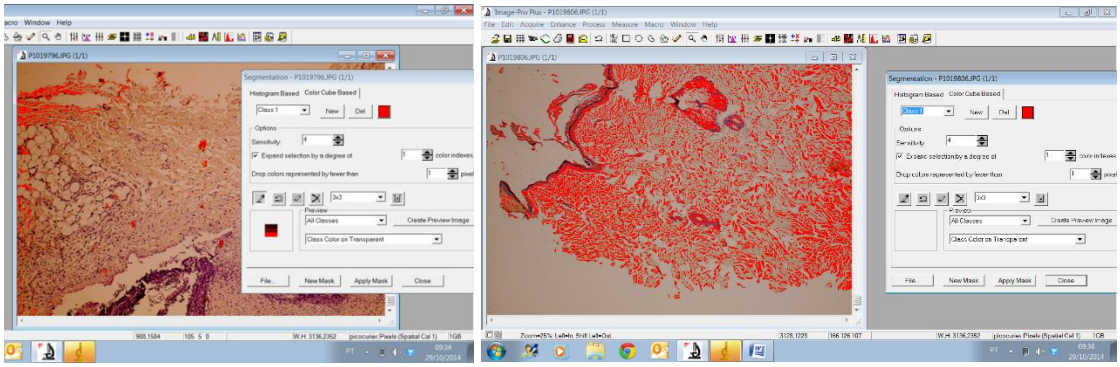


Figura 5: Representação da análise das áreas imunomarcadas através do programa Image - Pro Plus ® 4.5.
Fonte: Autor

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2007 e inicialmente avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Concluindo como resultado a distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA e “post hoc test” o teste de Tukey para comparação entre os grupos experimentais. Todos os dados foram expressos em valores de média e desvio padrão. Foi utilizado o software Prism® 5 (GraphPad, CA, USA). Diferenças entre a hipótese nula foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo

FIORIO FB, RAMBO CSM, DALBOSCO CG, SANTOS AJ, MELO BL, ALBERTINI, R, LEAL-JUNIOR ECP, CARVALHO PTC. Low level laser therapy in wound-repair process in aged rats" Submetido à Wound Repair and Regeneration. ISSN 1067-1927.

Os resultados deste estudo sugerem que o laser de baixa potência é eficaz na modulação de mediadores inflamatórios IL-6, CINC-1, VEGF, MMP-3, MMP-9, e o TIMP-2, bem como no aumento da produção de colágeno em animais idosos durante as diferentes fases do processo de regeneração do tecido.

Low level laser therapy in wound-repair process in aged rats

Franciane Barbieri Fiorio[1], Ms; Caroline Sobral de Melo Rambo[1], Ms; Camila Guerra Dalbosco[2], Graduate Student, Andrey Jorge dos Santos[3], PhD; Brunno Lemes de Melo[4], Graduate; Regiane Abertini[1], PhD; Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior[1,3], PhD; Paulo de Tarso Camillo de Carvalho[1,3], PhD

[1]Postgraduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil
[2]Health Sciences Center, Chapecó University (UNOCHAPECÓ), Chapecó, SC, Brazil
[3]Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil
[4]Postgraduate Program in Medicine (Cardiology), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil

Reprint requests:
Franciane Barbieri Fiorio, Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), São Miguel do Oeste, SC, Brazil, Graduate Program in Physicaltherapy, Rua Oiapoc, 211, São Miguel do Oeste, SC, Brazil; Tel: +55 49 84045993
E-mail: franciane.fiorio@unoesc.edu.br

Short running title: Photobiostimulation in wound old rat.

Key words: Wound healing; Low level laser; Inflammatory mediators, Age

Abstract

Previous studies have discussed an inverse correlation between age and wound healing, because it relates to the association of aging with a gradual decrease in healing capacity. Treatment with low level laser therapy (LLLT) improve wound healing by inducing increases in mitotic activity, numbers of fibroblasts, collagen synthesis, and neovascularization. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of LLLT in cutaneous wound healing in aged rats. A punch biopsy of 8 mm in diameter was performed to produce a skin wound. The study included 45 male rats, of which 15 were young (30 days) and 30 were elderly (500 days). The 45 animals were distributed into 3 experimental groups, which were subjected to skin wounds and 1aged group received LLLT, with a 30 mW laser beam (power density of 1.07 W/cm^2), beam area of 0.028 cm^2, and λ660nm produced through active phosphide Gallium-Aluminum-Indio (InGaAIP). The LLLT application took the form of a single-point transcutaneous method, with a total energy of 2 joules per wound site, energy density of 72 J/cm^2, and time of 1 minute and 7 seconds. Analysis was performed to verify the effect of LLLT on the quantity of collagen I and III, metalloproteinase 3 and 9 (MMP-3 and MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and of vascular endothelial growth factor (VEGF) at the wound site by immunohistochemistry, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and interleukin (IL)-6 by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). We conclude LLLT is effective in the modulation of inflammatory mediators IL-6, CINC-1, VEGF, MMP-3, MMP-9 and TIMP-2 as well as increased collagen production in aged animals during different phases of the tissue regeneration process. However, the effects of LLLT obtained in the aged animals (aged LLLT group) suggest that new dosimetries should be tested to achieve better results.

1. Introduction

Successful wound healing requires function of many cellular and molecular events that are coordinated to result in tissue repair or regeneration. Disturbances in any of these functions result in impaired wound healing. Wound repair can be thought of as the culmination of 3 major overlapping phases: inflammation, proliferation, and remodeling [1, 2].

Delayed wound healing in the aged is associated with impaired inflammatory responses with alterations in chemokine production, reduced macrophage phagocytic capacity, enhanced proteolysis and degradation of matrix constituents due to excessive leukocytes and inflammation, delayed re-epithelialization and neovascularization and impaired fibroblast migration are other characteristics of wound healing in elderly subjects [3, 4].

Overall, there are global differences in wound healing between young and aged individuals [4]. It has long been thought that pro-inflammatory cytokines, including interleukins (IL) 1α and 1β, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)-α, play an important role in wound repair. They likely influence various processes at the wound site, including stimulation of keratinocyte and fibroblast proliferation, synthesis and breakdown of extracellular matrix proteins, fibroblast chemotaxis, and regulation of the immune response [5, 6].

Chemokines, among which IL-8 are active participants in the healing process because it stimulates the migration of various cell types into the wound site; particularly inflammatory cells. IL-8 expression is increased in acute wounds and play a role in re-epithelialization by the increase in migration and proliferation of keratinocytes. It also induces the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) by leukocytes, and it is a strong chemoattractant for neutrophils, participating thus the inflammatory response. However, IL-8 at high levels decreases the proliferation of keratinocytes and the contraction of the collagen by fibroblasts structure [7].

MMPs play an important role in all stages of wound healing by degrading all components of the extracellular matrix (ECM) and have the capacity to synthesize collagen type III and IV (MMP-3), collagen type IV, V, VII, X, denatured collagen (MMP-9) and other MEC members who contribute to the remodeling of the wound [8]. MMPs have them release controlled by TIMPs. [9]. Many MMPs can also regulate the activity of chemokines and are also involved in neovascularization process due to interaction with vascular endothelial growth factor (VEGF) in the formation of new blood vessels [10].

Angiogenesis is another complex process that could play a role in wound healing. The aging-induced decrease in tissue perfusion and impairment of angiogenesis are known to affect wound healing [4].

Various treatments to reduce the delay of repair and problems in healing that occur with age have been studied both under normal conditions and under conditions

involving altered wound healing [7,11]. LLLT has been shown to be able to change the delay time and normalize wound healing parameters, mainly involving the modulation of inflammatory cytokines [12,13] and enhanced production of collagens type I and III [14, 15].

We propose, therefore, that LLLT can positively influence the healing process of cutaneous wounds during aging and can also positively modulate mediators of this process, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), MMPs, TIMP, collagen, and the pro-inflammatory cytokines IL-6 and CINC-1 (a homolog of human IL-8).

2. Materials and methods

2.1. Animals

The study animals consisted of 45 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*), of which 15 were young (30 days) with body weight ranging from 130–150 g and 30 were aged (500 days) with body weight ranging from 400–450 g. The animals were obtained from the animal housing facility of the Universidade Nove de Julho (Brazil) and kept under controlled conditions of light and temperature, with free access to water and chow. All experimental procedures were approved by the Institutional Research Ethics Committee (AN 0028/2014), and they were conducted according to the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation as well as the standards of the International Council for Laboratory Animal Science.

2.2. Experimental groups

Animals (15 young and 30 elderly) were randomly divided into a total of 3 groups each of 15 animals, which were further separated to 3 subgroups each containing 5 animals, according to the experimental time points of 3, 7, and 14 days. The groups were split as follows: “control aged”, elderly animals that only underwent skin wounding; “LLLT aged”, elderly animals that underwent skin wounding and LLLT; and “control young”, young animals that only underwent skin wounding.

The animals were anesthetized by an intramuscular injection of a 7% ketamine solution (Cetamin, Syntec, Cotia, SP, Brazil) and a 0.3% xylene solution (Xilazin, Syntec, Cotia, SP, Brazil) at a proportion of 2:1 and a total injection volume of 0.2 mL per 100 g body weight. All possible care was taken to avoid any discomfort to the animals. Once anesthetized, the animals were placed in the prone position; the site was

sterilized with alcohol-iodine, and the dorsum of the animal was shaved. Skin wounding was performed using an 8 mm diameter 'punch' with a circular blade, allowing the removal of a circular area of skin. Four wounds were inflicted on each animal, with the site of wounding located in the middle portion of the median sagittal plane. After wounding, the injured animals were placed in clean cages, 5 animals in each cage, and freely provided with water and chow. The analgesic dipyrone was administered for 2 days after wounding at a dose of 0.1 mL/animal, 4 times daily, with a minimum of 4 hours between doses.

2.3. Laser application

We used the Photon Laser III® (DMC Equipment's LTDA, SP, Brazil) for LLLT, with a λ660nm laser beam produced through active phosphide Indio-Gallium-Aluminum (InGaAIP) according to the following parameters: frequency continuous, power density 1.07W/cm^2, power output 30 mW, spot size 0.028 cm^2, energy density 72 J/cm^2,total energy delivered 2 Joules, irradiation time per treatment 67 seconds. The application of LLLT was initiated immediately after skin wounding, and then on alternate days until the day of euthanasia for each group. The control group underwent the same experimental procedures, but did not receive LLLT.

2.4. Euthanasia

At the end of each period of 3, 7, and 14 days, the animals were weighed and then euthanized via intracardiac injection with thiopental sodium (Cristália Lab, SP, Brazil) at the dose of 0.05 mL per 100 g body weight. After euthanasia, following the indicated times, the wounded areas were surgically removed with a 1 cm margin of skin around the lesion depth to the fascia. The resulting samples, which were taken from 2 animals per time point, were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Of the 2 samples per time point, 1 sample was allocated for imunohistochemical procedures and the other sample was allocated for the analysis of protein expression by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and gene expression by RT-PCR.

2.5. Histological procedures and quantification of collagen

Samples frozen in liquid nitrogen were placed in OCT™ (Sakura, Finetechnical Co. Ltd., Japan) and 4 mm sections were prepared using a cryostat (CM 1850, Leica,

Germany) and histological sections stained not willing to slides silanized for immunohistochemistry.

2.6. Immunohistochemistry

The frozen sections were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% H_2O_2 in methanol for 30 min. The sections were washed in PBS (6 × 5 min washes) and mounted with 1% normal goat serum in PBS for 30 min. Subsequently, the slides were incubated in the presence of primary antibody applied overnight at 4°C. Primary antibodies used were: VEGF: mouse anti-rat VEGF antibody (VG-1; Abcam, Tokyo, Japan), TIMP-2: goat anti-TIMP-2 antibody (sc6835, Santa Cruz Biotechnology, Inc), MMP-3: rabbit anti-MMP-3 antibody (ab-53015, Abcam, Tokyo, Japan), MMP-9: goat anti-MMP-9 antibody (sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Collagen I: mouse Antibody (Col-1) (sc-59772, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Collagen III: rabbit Antibody (S-17)-R (sc-8780 R, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After washing in PBS (6 times, 5 min), they were incubated with secondary antibody, agreement with primary antibody used, for 30 min. After washing in PBS (6 × 5 min washes), a coloring reaction was carried out with diaminobenzidine (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and nuclei were counterstained with hematoxylin. Areas of positive staining for each of the tags was observed under a light microscope (E200, Nikon, Japan), and images were captured by a microcomputer equipped with IC Capture 2.2 software (The Imaging Source, Germany). From each sample, 4 images were recorded of different fields of view, including each part of the stained, using a 10× objective so that the length was captured. Once captured, the images were analyzed using a software-based image analysis system (Image-Pro Plus® 4.5, Media Cybernetics, MD, USA).

2.7. Gene expression quantification

Total RNA was extracted from skin wound samples and RT-PCR assay was performed for mRNA quantification. Thawed tissues were homogenized in 1 mL of TRIzol® reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and total RNA was isolated according to the manufacturer´s instructions. One microgram of total RNA was used for cDNA synthesis and RT-PCR gene expression analysis. Initially, contaminant DNA was removed using DNase I (Invitrogen) at a concentration of 1 unit/µg RNA in the presence of 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, containing 2 mM $MgCl_2$ for 15 min at 37 °C, followed by

incubation at 95 °C for 5 min for enzyme inactivation. Then, the reverse transcription (RT) reaction was carried out in a 200 µL reaction volume in the presence of 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTPs, and 50 ng of random primers with 200 units of Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA). The reaction conditions were 20 °C for 10 min, then 42 °C for 45 min, and finally 95 °C for 5 min.

The reaction product was amplified by real time PCR on the 7500 Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SYBR Green® core reaction kit (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were: 50 °C for 2 min, then 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles, each at 95 °C for 15 s and then 60 °C for 1 min. Experiments were performed in triplicates for each data point. Target gene mRNA abundance was quantified as a relative value compared with an internal reference, GAPDH, whose abundance was believed not to change between the varying experimental conditions. Primers used for RT-PCR were: IL-6; GenBank accession number E02522, forward primer 5′-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3′ and reverse primer 5′-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3′. One microliter of RT reaction mix was used for RT-PCR.

2.8. Evaluation of the inflammatory mediators CINC -1

The amount of CINC-1 in skin wounds was quantified by ELISA (R&D Systems, USA) as per the manufacturer's instructions. For this purpose, 96-well plates were coated with 100 mL of monoclonal antibody for each cytokine: anti-CINC-1 diluted in sodium carbonate buffer (0.1 M, pH 9.6). The plates were incubated at 4 °C for 18 h. For blocking, the plates were washed 4 times with PBST (PBS containing 0.05% Tween®-20) and then filled with 300 µL/well of blocking solution (3% gelatin in PBST, Sigma) at 37 °C for 3 h before being subjected to a new cycle of washes. Next, 100 µL/well of diluted samples or recombinant cytokine standards were added to the plate and incubated for 18 h at 4 °C. After washing, 100 µL/well of the respective biotinylated antibody specific for the detection of each cytokine was added and left for 1 h at room temperature (RT). After washing the plates, 100 µL/well of streptavidin–peroxidase was added and incubated for 1 h at room temperature (22 °C) followed by further washes. The reaction was visualized by adding 100 µL/well of 3,3′5,5′-tetramethylbenzidine solution and stopped by adding 50 µL/well of sulfuric acid (2 N). The absorbance of each well was read using a SpectraMax® Plus 384 spectrophotometer

(Sunnyvale, CA, USA) at a wavelength of 450 nm with correction at 570 nm. The sample concentrations were calculated from standard curves obtained with recombinant cytokines.

2.9. Statistical analysis

The data were tabulated using Excel 2007 software (Microsoft Corporation, WA, USA) and initially assessed for normality using the Shapiro–Wilk test. Since a normal distribution was observed, ANOVA with Tukey's post hoc test was used for comparisons between experimental groups. All of the data were expressed as mean and standard deviation values. Prism® 5 software (GraphPad, CA, USA) was used. Differences from the null hypothesis were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of LLLT on IL-6 mRNA expression in wound healing

Figure 1 shows a statistically significant increase of IL-6 mRNA expression between aged control group and control young group in 3, 7 and 14 days after injury. When compared the LLLT aged and control young groups, also occurred a significant increase on day 3 and on days 7 and 14. Although the aged groups showed higher expression compared the control young group, LLLT promoted a significant decrease expression in LLLT aged group on days 3, 7 and 14 days.

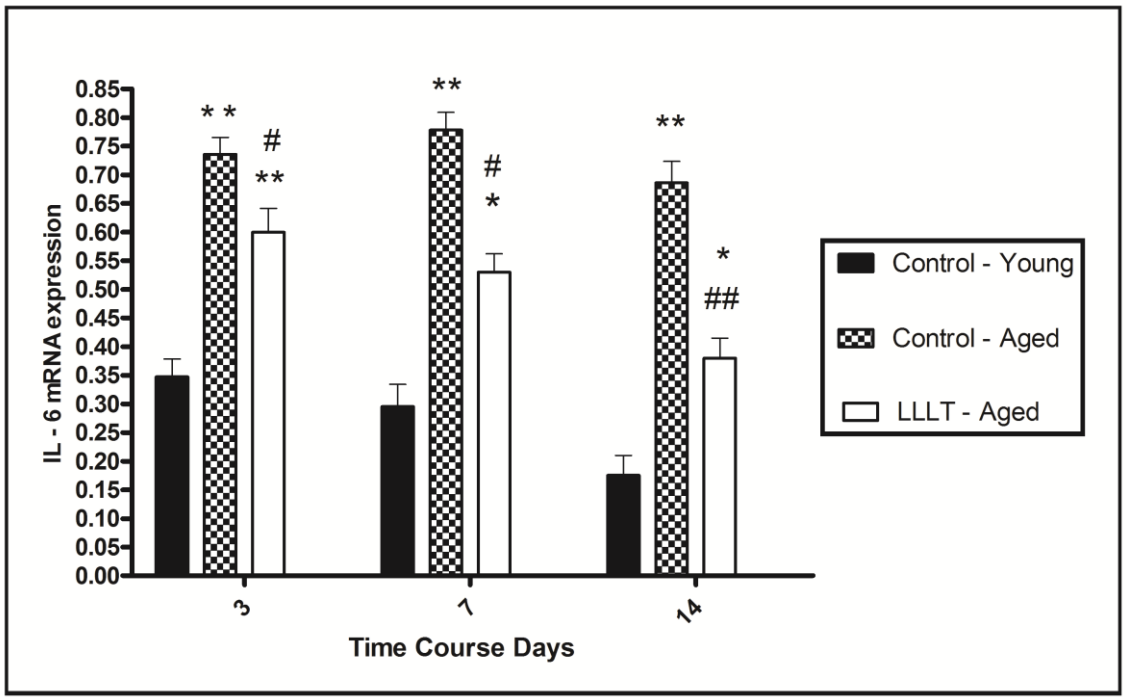


Figure 1. Comparisons of the mean and standard deviation levels of CINC-1 (a homolog of human IL-8) in skin wound tissue over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control aged group.

3.2 Effect of LLLT on CINC -1 protein expression

The control young group showed a significant decrease in the concentration CINC-1 compared with the control aged and LLLT aged groups at 3 and 7 days post-wounding. At 14 days showed a significant decrease compared to aged (control and LLLT) groups, however, LLLT administration led to a significant decrease in expression of IL-8 protein when comparing the aged (control and LLLT) groups, in 3, 7 and 14 days after injury (Figure 2).

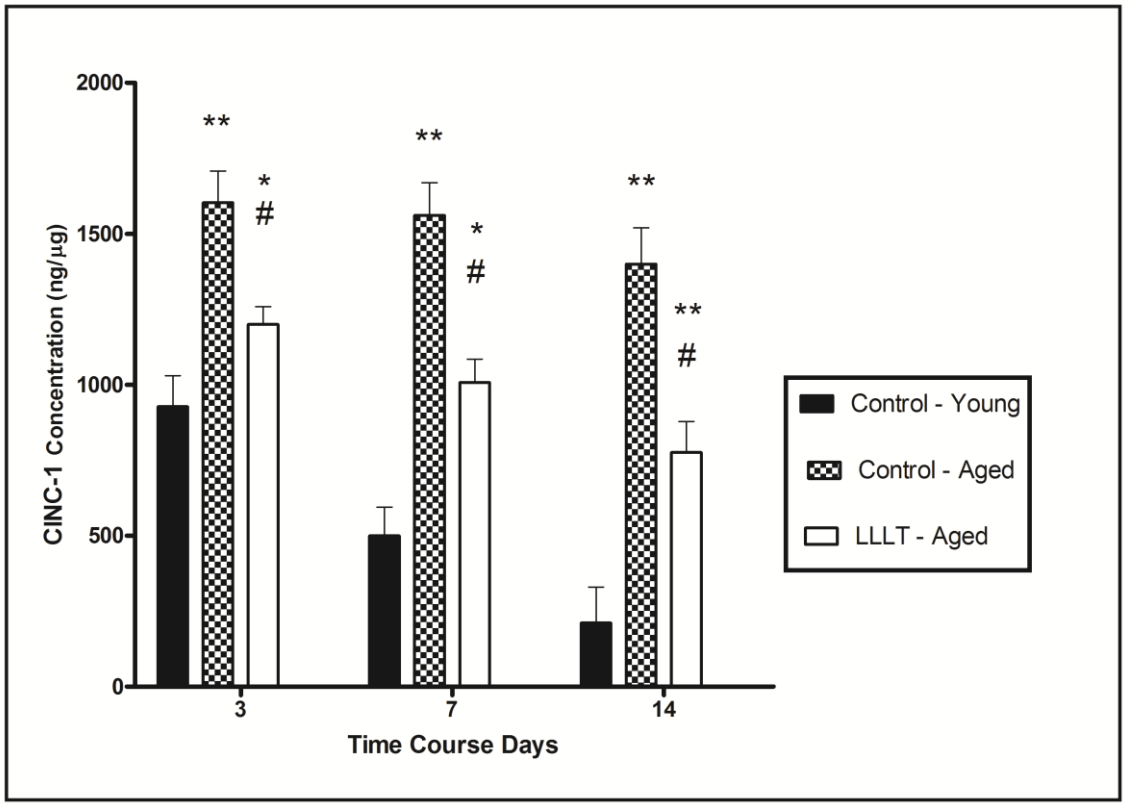


Figure 2. Comparisons of the mean and standard deviation levels of IL-6 in skin wound tissue over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using Tukey's test with comparisons against the control young group; #p<0.05—using Tukey's test with comparisons against the control age group.

3.3. Effect of LLLT on metalloproteinase 3 (MMP-3)

At 3 and 7 days post-wounding the control young group showed a significant lower percentage of MMP-3 compared the control aged and LLLT aged groups, However the LLLT aged group showed a significant decrease compared the control aged group. At 14 days the aged (control and LLLT) groups showed a significantly higher percentage than the control young group, however LLLT aged group showed significantly lower percentage than the control aged group (Figure 3)

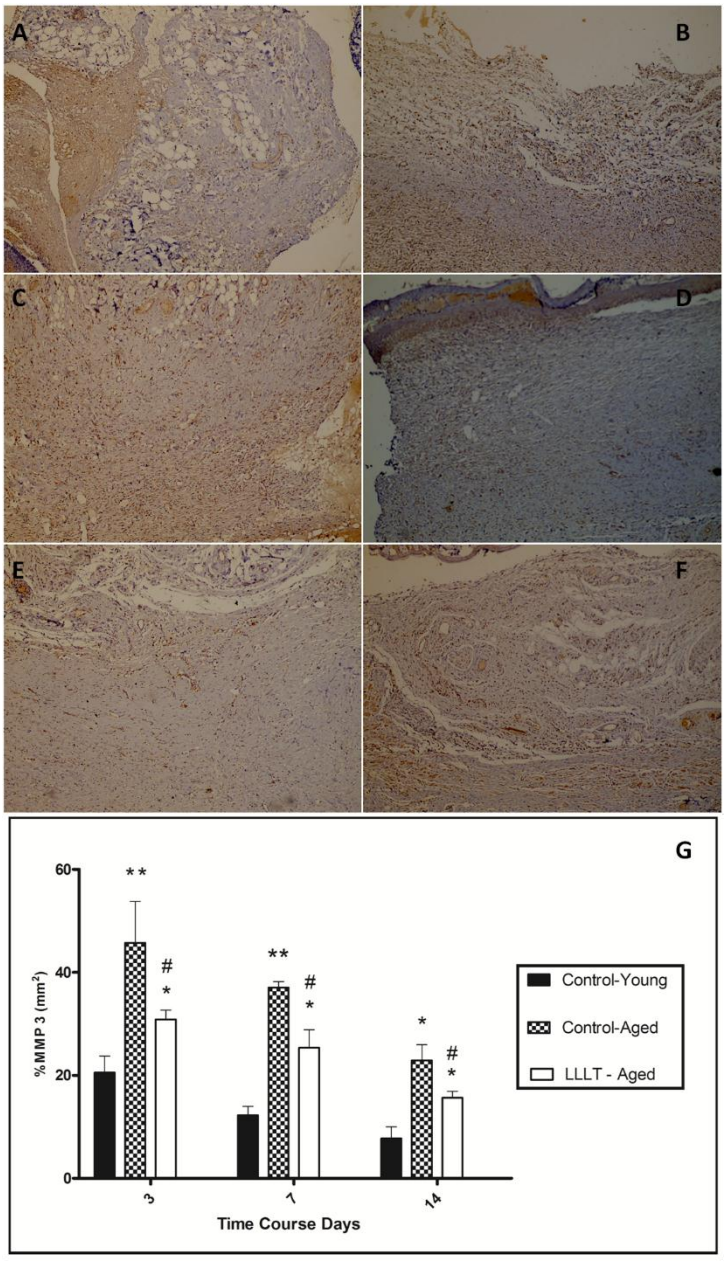


Figure 3: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of MMP-3 in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows

the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of MMP-3 over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *$p<0.05$, **$p<0.001$—using Tukey's test with comparisons against the control young group; $^{\#}p<0.05$—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm.

3.4. Effect of LLLT on metalloproteinase 9 (MMP-9)

The percentage of MMP-9 in control young group showed to be significantly lower that the control aged and LLLT aged groups at 3 and 7 days post-wounding, however LLLT reduced significantly the percentage of the LLLT aged group compared with control aged group. At 14 days, the control young group showed a significant decrease percentage compared aged (control and LLLT) groups and LLLT aged group showed significant decrease compared control aged group, proving the LLLT biomodulatory effects (Figure 4).

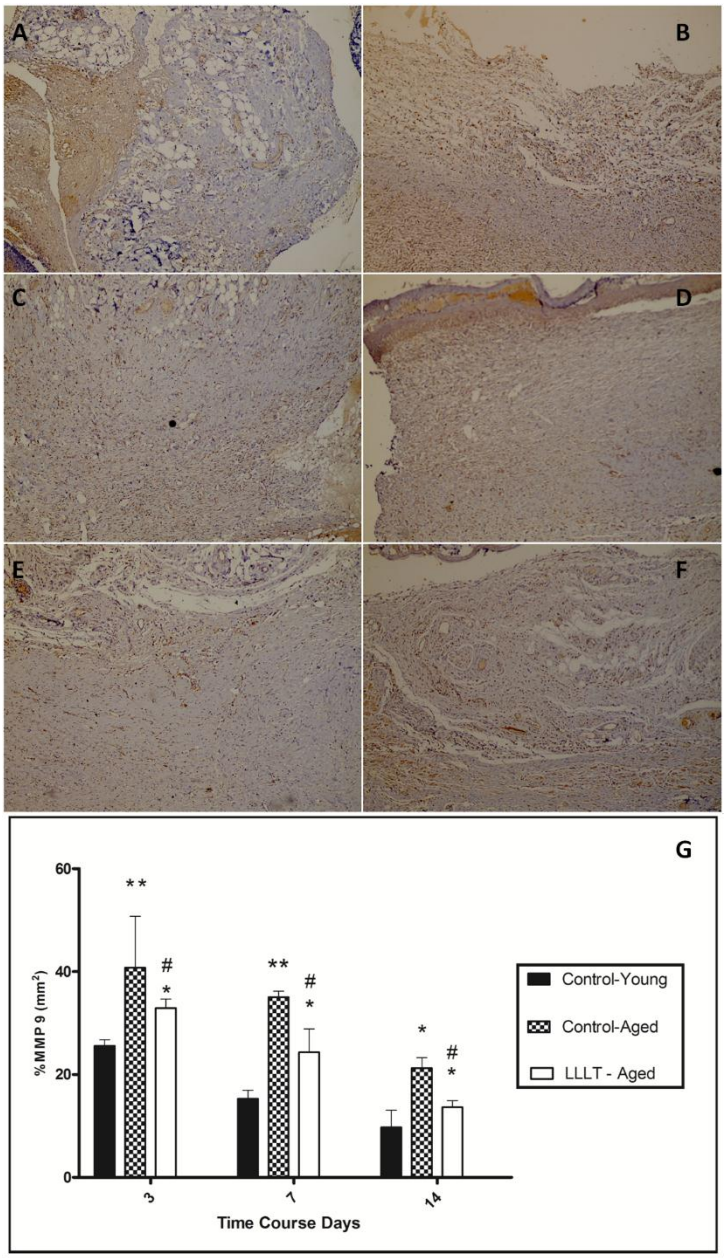


Figure 4: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of MMP-9 in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of MMP-9 over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *$p<0.05$, **$p<0.001$—using Tukey's test with comparisons against the control young group; $^{\#}p<0.05$—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm.

3.5. Effect of LLLT on TIMP-2

At 3 days post-wounding, the control young group showed significantly higher expression of TIMP-2 than aged (control and LLLT) groups and LLLT aged group showed higher expression than the control aged group. At 7 and 14 days, control young group had significantly higher expression than the control aged and the LLLT aged groups. However, despite the aged groups have lower expression than the control young group, the LLLT aged group showed significantly higher expression of TIMP-2 than the control aged group (Figure 5).

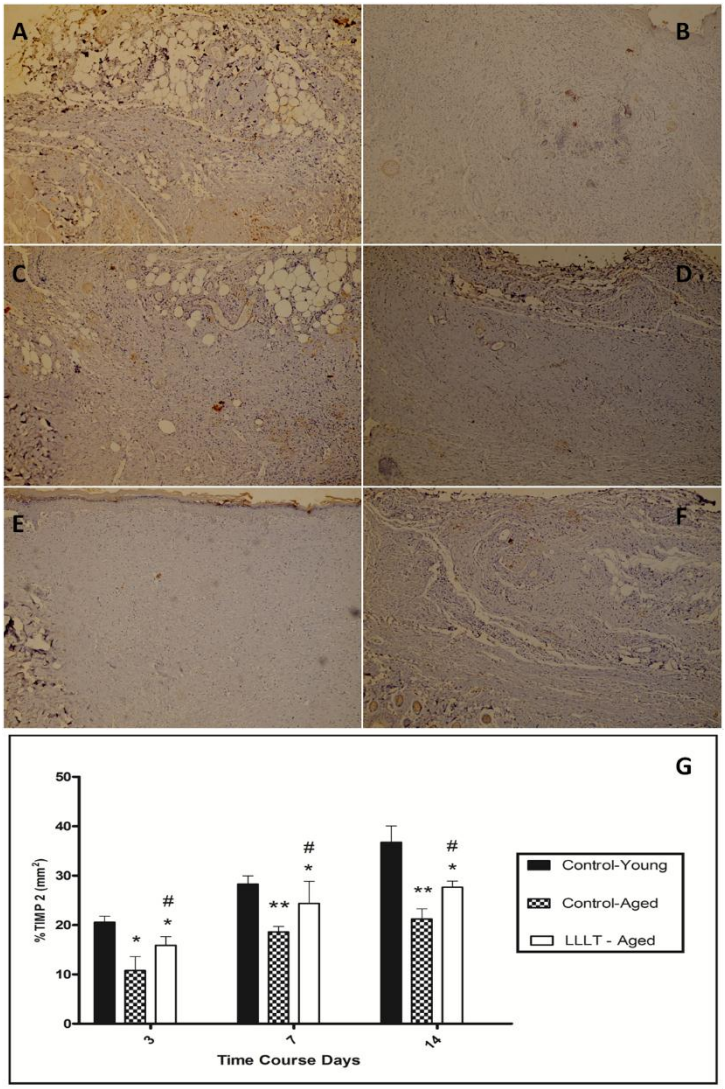


Figure 5: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of TIMP-2 in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of TIMP-2 over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *p<0.05, **p<0.001—using

Tukey's test with comparisons against the control young group; $^{\#}p<0.05$—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm.

3.6 Quantification of collagen I

Significant differences in the percentage of collagen I deposition at the wound site were observed among groups at 3 days post-wounding. There was a significant difference in the means of the percentage of collagen deposition at the wound site between the control young and aged (control and LLLT) groups. At 7 days, groups had similar behavior at 3 days, with significant differences between groups. At 14 days, the control young group showed significantly higher expression that the control aged and LLLT aged groups. There was also a significant difference between the control aged and LLLT aged groups, showing the biomodulatory effect of laser in deposition of collagen type I (Figure 6).

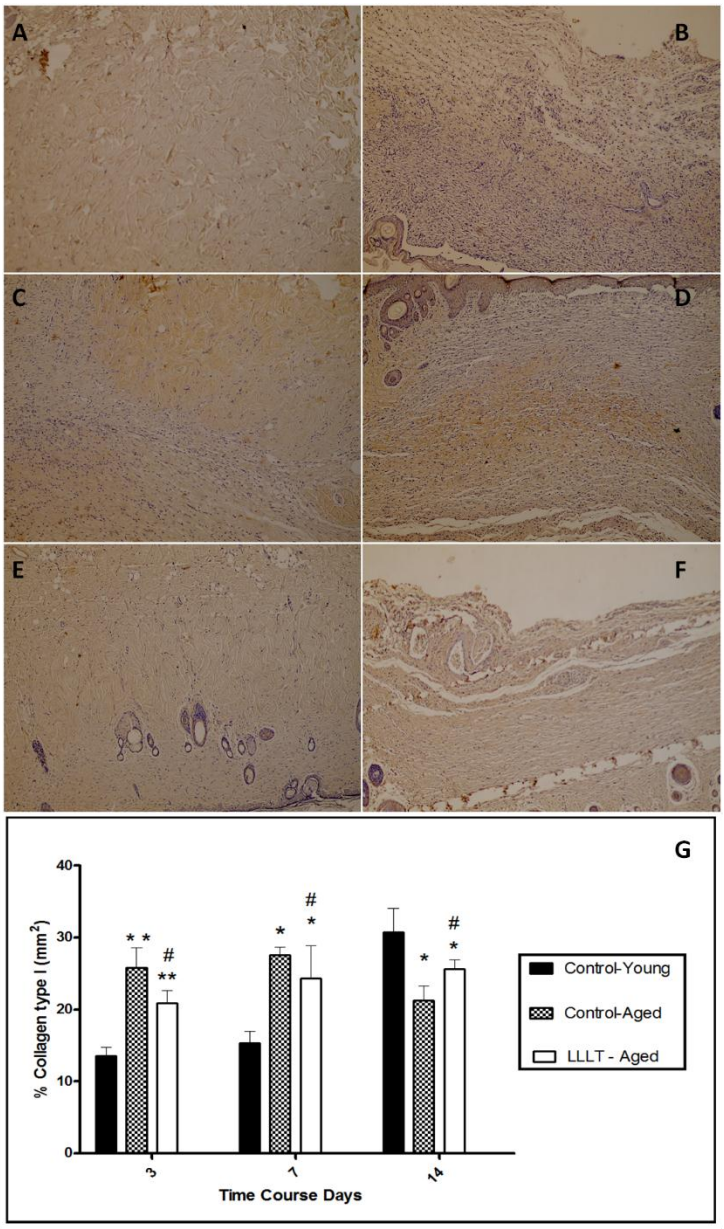


Figure 6: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of collagen type I in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of collagen type I over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *$p<0.05$, **$p<0.001$—using Tukey's test with comparisons against the control young group; $^{\#}p<0.05$—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm.

3.7 Quantification of collagen III

At 3 days post-wounding was found significant lower percentage of collagen III deposition at the wound site in the aged (control and LLLT) groups compared with control young group, however the LLLT aged group had higher percentage than the control aged group. At 7 days aged (control and LLLT) groups also had percentage of collagen III lower than the control young group and the LLLT aged group obtained higher percentage than the control aged group. However, at 14 days the control young group had lower amount of collagen than the control aged and LLLT aged groups, and the LLLT aged group had a lower percentage than the control aged group (Figure 7).

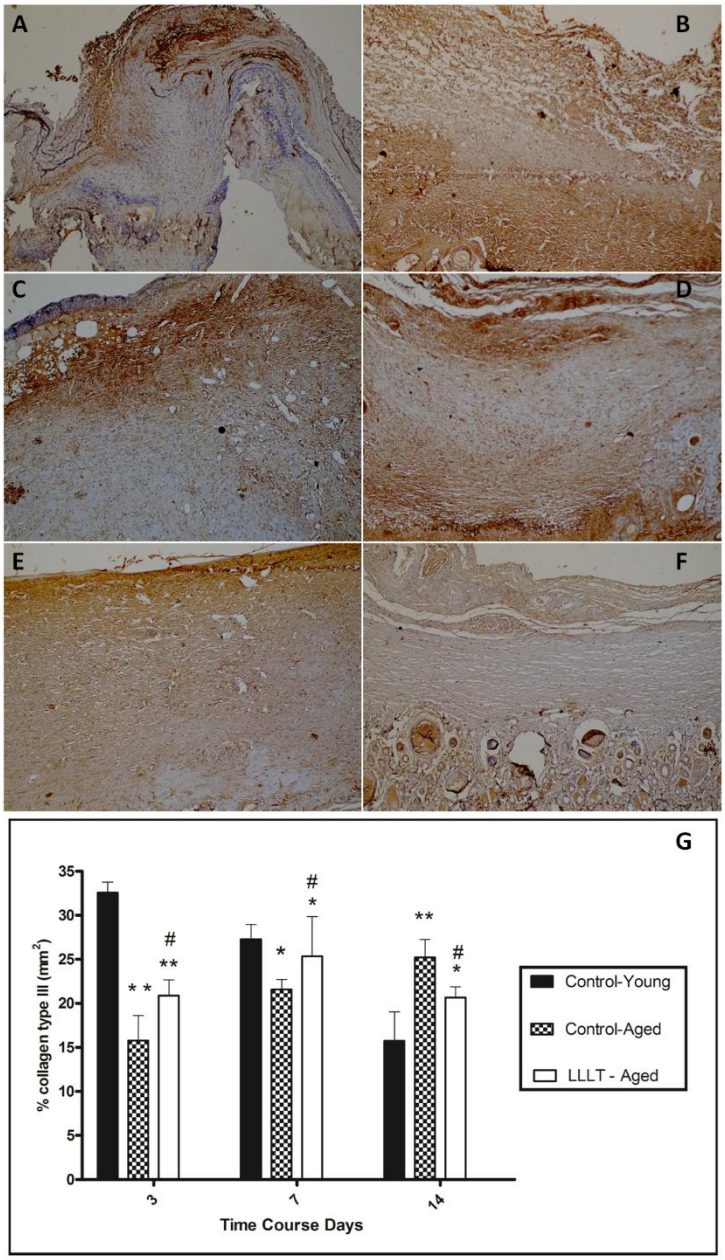


Figure 7: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of collagen type III in wounds 3 days after injury; panels C (control-young) and D (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 7 days after injury; and panels E (control-young) and F (LLLT-aged) represent concentrations in wounds 14 days after injury. G shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of collagen type III over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *$p<0.05$, **$p<0.001$—using Tukey's test with comparisons against the control young group; $^{\#}p<0.05$—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm.

3.8 Effect of LLLT on Vascular endothelial growth factor (VEGF)

The control young group showed a significantly higher percentage of VEGF compared with control aged group in 3 and 7 days, and at 14 days showed significantly lower percentage compared with the same group. When compared with LLLT aged group showed significant increase in 3 and 7 days, and at 14 days showed no statistical difference. The LLLT aged group showed a significant increase in the percentage of VEGF at 3 and 7 days compared with control aged group, and at 14 days showed a significant decrease compared with same group, getting approximate values to the control young group (Figure 8).

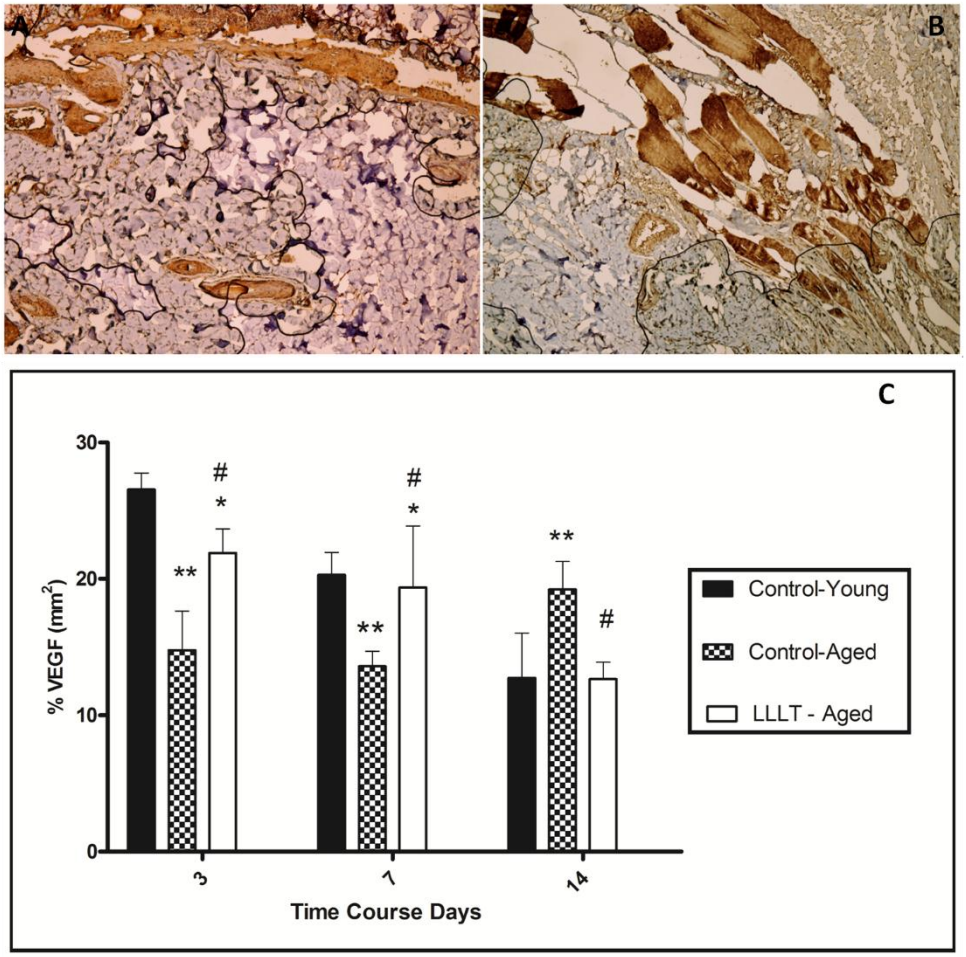


Figure 6: Panels A (control-young) and B (LLLT-aged) represent concentrations of VEGF in wounds 7 days after injury. C shows the comparisons of the mean and standard deviation concentrations of VEGF over 3, 7 and 14 days after preparation of the wound healing. *$p<0.05$, **$p<0.001$—using Tukey's test with comparisons against the control young group; $^{\#}p<0.05$—using Tukey's test with comparisons against the control age group. The sections were viewed with a×10 objective. Scale bar, 0,01 mm.

4. Discussion

The present study was designed to seek possible explanations as to whether the behavior of the healing process in elderly animals may be similar to that of the young animals already studied in previous work by our research group [16]. We observed that the response to LLLT was different in aged rats compared with young rats. The present study was conducted to analyze the gene expressions of pro-inflammatory cytokine (IL-6) protein expression and a cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1), a chemokine that belongs to the interleukin 8 family, and immunohistochemical expression of VEGF, MMP-3, MMP-9, TIMP-2, collagen type I and III.

The main results of this study included the following: the behavior of the repair process occurred differently between young and aged rats, with an obvious delay in the aged groups, as was verified by analysis of collagen and the expression of inflammatory mediators. The aged group treated with LLLT showed an increased rate of wound repair process, compared with their respective control group; however, the LLLT aged group still showed a lag in repair compared with the control young group, mainly regarding the inflammatory phase and proliferation, angiogenesis, and fibrogenesis.

The early response to wounding also results in the release of chemokines by keratinocytes, which act as chemoattractants for the migration of immune cells to the site of injury. Neutrophils arrive at the wound within minutes of wounding and become the predominant cells in the wound site for the first 2 days after the injury occurs. Neutrophils and platelets entrapped and aggregated in the blood clot release a wide variety of factors that amplify the aggregation response, initiate the coagulation cascade, and/or act as chemoattractants for cells involved in the inflammatory phase. Among other proinflammatory cytokines, IL-6 is produced by neutrophils and has been shown to be important in initiating the healing response; IL-6 has mitogenic and proliferative effects on keratinocytes and, at the same time, acts as a chemoattractant for neutrophils [18]. CINC-1 (a homolog of human IL8) expression increased the migration and proliferation of keratinocytes, induces the expression of MMPs and it is a strong chemoattractant for neutrophils [7].

According to Ershler and Keller (2000) [21], IL-6 is normally expressed at low levels except during infection, trauma or other stress factors. Among the many factors that regulate the expression of the IL-6 gene are estrogen and testosterone. After menopause or andropause, levels of IL-6 are elevated in the absence of infection, trauma or stress.

After tissue injury, IL-6 expression increases in the 15 to 20 minutes of injury, with peak levels in 24-48 hours, gradually reducing in 7 days [18]. CINC-1 shows increased expression in the first hour after injury, down to 24 hours of follow-up, when it starts an increase up to 48 hours and from 7 days ago decreased expression [19]. The three groups of our study showed higher expression of IL-6 and CINC-1 in the initial phase of the repair process, decrease over time, however, the aged groups showed high values of IL-6 and CINC-1 and that LLLT was effective in decreasing the expression of these inflammatory mediators, throughout the experimental period. However, it is observed that although LLLT have attenuated the levels of IL-6 and CINC-1, the

expression was higher than in the control young group. This finding suggests a new proposal for LLLT dosimetry, which may be used in aged animals to achieve better results. This finding reinforces the results achieved by Rambo et al. [16] similar to ours in that compared the levels of pro inflammatory cytokines (IL-1 and TNF) in young and old animals, and these suggest a differentiated dosimetry of LLLT for treatment of young and aged.

The presence of elevated levels of IL-6 and IL-8 in the older age groups was also found by Sansoni et al. [20] showing a chronic inflammatory state.

The potential of LLLT in modulating inflammatory cytokines among them the IL-6 and CINC -1 is clear in the study. Alves et al. [21] found that LLLT reduces IL-6 expression in joint inflammation in rats. On human cell cultures, the red laser increased the migration and proliferation of keratinocytes and the granulation tissue, by modulating IL-8 expression promoting more rapid re-epithelialization [22]. Lima et al [23] reported that LLLT (GaAlAs, continuous, 9 mW, 670 nm, 0.031 W / cm2) significantly decreased IL-6 levels, strongly suggesting an inflammatory biomodulation of LLLT.

Ambrosch, et al. [24] found that the reduction of inflammation, reduces IL-6 concentration, followed by decreased levels of MMPs and TIMP increased. MMPs expression is regulated by interleukins, TIMPs and other factors and play essential roles in all phases of the healing process. They degrade all components of the extracellular matrix, stimulate migration of epithelial cells, fibroblasts, vascular endothelial cells and synthesize collagen and other members of the ECM [8,10].

MMP-3 has anti-inflammatory effect, increases cell migration into the damaged tissue as well as degrading proteoglycan, fibronectin, collagen type III and IV [10] and can also enhance the proteolytic effect of MMP-9, which acts on the type IV collagen, elastin and collagen denatured [25].

In our study the MMP-3 and MMP-9 expression was higher in aged groups (control and LLLT) in all phases of repair compared to the control young group, however the aged group treated with LLLT showed expression below its old control showing LLLT capacity of reducing MMP-3 and MMP 9 expression. MMPs prolonged overexpression degrades essential proteins for the healing process, leading to delay the healing process or abnormal scar formation [26]. Thus, MMPs modulation is essential in the process of repair and LLLT is effective in this modulation.

High levels of MMPs can also degrade the growth factors such as PDGF, EGF, VEGF, and consequently there is a decrease or absence of proliferation essential cells for tissue replacement, such as fibroblasts which has function of synthesize collagen [27].

TIMPs function modulates the activity of MMPs and especially TIMP-2 has strong attraction to MMP-3 [10, 28].

In our study, we observed that in the control young group, TIMP-2 expression was increased in relation to aged groups (control and LLLT), and against MMP-3 and MMP-9 was decreased in all phases of repair. This proves that the TIMP modulates MMP expression. However, it is observed that although the expression was lower in the control young group, the LLLT induced a higher TIMP-2 expression in the LLLT aged group compared to the control aged group showing the effect of LLLT in biomodulatory TIMP and MMPs expression.

Studies show that IL-6 [29], IL-8 [30] and MMP-9 [31] are involved in angiogenesis due to their interaction with the endothelial growth factor (VEGF) in the formation of new blood vessels.

The angiogenesis is a critical and complex event in the wound-healing process. It depends on both angiogenic growth factors present and ECM components participating in granulation tissue and in microvascular vessels. The cooperative regulation of the activities of growth factors and the production of ECM components is essential for wound repair. Vascular endothelial growth factor (VEGF or VEGFA), which exerts its biological activity predominantly on endothelial cells, is a key mediator of angiogenesis [32].

In our study, the results of an analysis of VEGF immunohistochemistry demonstrated that, although the control young group had a higher VEGF expression than older groups at all stages of repair, LLLT increased expression in the elderly group treated at 3 and 7 days. Another factor observed at 14 days following injury the elderly control group reached levels of VEGF higher than other groups, leading us to believe in the process of these aged animals delay.

Our results for the effects of LLLT on VEGF are similar to those obtained by Colombo et al. [33], who investigated angiogenesis in the dorsal cutaneous wounds of rats treated with laser (λ660 nm, 16 mW, 10 J/cm^2). They concluded that laser treatment (λ660 nm) contributed to increased angiogenesis.

Szymanska et al [34] evaluated the laser effects on the vascular endothelial proliferation in vitro and VEGF secretion, and they concluded that LLLT with wavelength 635 nm increases endothelial cell proliferation. Significant increase in endothelial cell proliferation and corresponding decrease in VEGF concentration may suggest the role for VEGF in the healing process. In addition, Galiano et al. [35] assert that therapeutic restoration of VEGF has been shown to improve significantly repair outcomes, and LLLT proves efficient in modulating VEGF.

Angiogenesis restores the level of both oxygen and nutrients for the newly forming tissue, supplying the high metabolic demand, favoring protein synthesis as well as cell proliferation and migration, such as fibroblasts, which is one of the functions synthesize collagen [33].

We observed that in the control young group, the collagen I and III showed a normal course in the repair process, with greater deposition of collagen III and consequently less deposition of collagen I at the early phase, and increased deposition of collagen I and lower collagen III in the late phase of the process. In aged groups, we found that there was a delay in the deposition of collagen type I and III when compared to the control young group, however LLLT was able to reduce this delay in the LLLT aged group, especially in collagen III in the early stages of repair and collagen I at 14 days after injury.

The less collagen deposition in aged groups may be related to the small number of fibroblasts found in aged skin [36]. The improvement in collagen deposition in the LLLT aged group can be explained by the fact that the laser helps the proliferation of fibroblasts [16], so there will be more collagen deposition.

Increased collagen deposition at the beginning of the healing process with LLLT was also found by Biondo-Simões and Busnardo [37], with increased deposition of collagen III in the 3rd postoperative day and by Silva et al. [15] in wounds of diabetic rats with an increase in the total percentage of type III collagen.

Other studies have found increased collagen deposition with laser use. Fiorio et al [38] found increase collagen deposition in third-degree burns in rats. Carvalho et al. [39] demonstrated that the application of low intensity He-Ne laser (λ632.8 nm) promoted increase in the percentage of collagen in skin of diabetic rats wounds by increasing the amount of collagen fibers similar to process observed in animals non-diabetic efficacy, indicating of LLLT effects in the healing process.

The healing process involves the coordinated efforts of several cell types such as cytokines, chemokines, metalloproteinases and their inhibitors, growth factors and fibroblast, that will deposit collagen in the wound. According to the results of this study, we conclude that even in aged tissue there is delayed healing, this tissue satisfactorily responded to LLLT with modulation of inflammatory mediators IL-6, CINC-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and VEGF as well as increased collagen production in aged animals during different phases of the tissue regeneration process.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian Research Council (CNPq) for funding this study via a Research Productivity scholarship (Process nº 307665/2012-7).

Conflicts of interest

The authors of this paper declare no conflict of interest.

References

1. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW.The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. J Anat 1995;187(Pt 1):1-26.
2. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Curr Probl Surg 2001;38(2):72-140.
3. Sgonc R, Gruber J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. Gerontology 2013;59(2):159-64.
4. Soybir OC, Gürdal SÖ, Oran EŞ, Tülübaş F, Yüksel M, Akyıldız Aİ, Bilir A, Soybir GR. Delayed cutaneous wound healing in aged rats compared to younger ones. Int Wound J 2012;9(5):478-87.
5. Ayuk SM, Houreld NN, Abrahamse H. Collagen production in diabetic wounded fibroblasts in response to low-intensity laser irradiation at 660 nm. Diabetes Technol Ther 2012;14(12):1110-7.
6. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines Physiol Rev 2003;83(3):835-70.
7. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 2008;16(5):585-601.

8. Araújo RVS, Silva FO, Melo-Junior MR, Porto ALF. et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. R. Ci. md. Boil 2011;10(1):82-88.
9. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. Matrix Biol 2007;26(8):587-596.
10. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovascular Research 2006;69:562 – 573.
11. Houreld NN, Sekhejane PR, Abrahamse H.Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. Lasers Surg Med 2010;42(6):494-502.
12. Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H.Infrared_low-level_diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. Lasers Med Sci 2013;28(5):1305-13.
13. Sekhejane PR, Houreld NN, Abrahamse H. Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro. Photomed **Laser** Surg 2011;29(8):521-30.
14. Gonçalves RV, Mezêncio JM, Benevides GP, Matta SL, Neves CA, Sarandy MM, Vilela EF .Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser andhealing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. Braz J Med Biol Res 2010;43(4):350-5.
15. Aparecida Da Silva A, Leal-Junior EC, Alves AC, Rambo CS, Dos Santos SA, Vieira RP, De Carvalho Pde T. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagentypes I and III. J Cosmet Laser Ther 2013;15(4):210-6.
16. De Melo Rambo CS, Silva JA Jr, Serra AJ, Ligeiro AP, de Paula Vieira R, Albertini R, Leal-Junior EC, de Tarso Camillo de Carvalho P. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. Lasers Med Sci 2014;29(5):1723-33
17. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. Annu Rev Med 2000;51:245-70.
18. Grellner W. Time-dependet immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) in human skin wounds. Forensic Science International 2002;130:90-96.

19. Szekanecz Z, Shah MR, Harlow LA, Pearce WH, Koch AE. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. Pathobiology 1994; 62:134-9.
20. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, et al. The immune system in extreme longevity. Experimental Gerontology 2008,43(2):61-65.
21. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, de Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. Arthritis Res Ther 2013;15(5):R116.
22. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol 1996;107(4):593-6.
23. Lima AA, Spínola LG, Baccan G, Correia K, Oliva M, Vasconcelos JF, Soares MB, Reis SR, Medrado AP. Evaluation of corticosterone and IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. Lasers Med Sci 2014;29:709–715.
24. Ambrosch A, Halevy D, Fwity B, Brin T, Lobmann R. Effect of daptomycin on local interleukin-6, matrix metalloproteinase-9, and metallopeptidase inhibitor 1 in patients with MRSA-Infected diabetic foot. Int J Low Extrem Wounds 2013;12(2):100-5.
25. Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix melatalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. Lab Invest 1994;70:176-82.
26. Gibson, D.; Cullen, B.; Legerstee, R.; Harding, K.G.; Schultz, G. MMPs Made Easy. Wounds International 2009; 1(1): Available in http://www.woundsinternational.com
27. Bucalo B, Eaglstein W, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. Wound Rep Reg 1993;1:181-186.
28. Yoshiba N, Yoshiba K, Stoetzel C, Perrin-Schimitt F, Cam Y, Ruch JV et al. Temporal gene expression and protein localization of matrix metalloproteinase and their inhibitors during mouse molar tooth development. Dev Dyn 2003; 288: 105-123.

29. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. J Leukoc Biol 2003;73(6):713-21.
30. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 deficient colon cancer cells. Nature Med 2005;11:992–997.
31. Sivaka JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. Progress in Retinal and Eye Research. 2002;21(1):1–14.
32. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. Microsc Res Tech. 2003;1;60(1):107-14.
33. Colombo F, Neto Ade A, Sousa AP, Marchionni AM, Pinheiro AL, Reis SR. Effect of low-level laser therapy (λ660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. Braz Dent J. 2013;24(4):308-12.
34. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, Zalewski P, et al. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. J Physiol Pharmacol. 2013;64(3):387-91.
35. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. Am J Pathol. 2004;164(6):1935-47.
36. Wulf H.C, Sandby-Moller J, Kobayasi, T, Gniadecki, R. Skin aging and natural photoprotection. Micron 2004;35:185-191.
37. Busnardo VL, Biondo-Simões MLP. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. Rev. bras. fisioter. 2010;14(1).
38. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. Lasers Med Sci. 2014;29(1):313-9.
39. Carvalho PTC, Mazzer N, Reis FA, Belchior ACG, Silva IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. Acta Cir. Bras 200621(3).

5. DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que envolve a restauração da integridade celular. Obedecendo esse processo, todas as feridas precisam progredir por certas fases biológicas, que incluem a hemostasia e inflamação, proliferação e maturação, e remodelação, as quais são definidas e reguladas por populações celulares e atividades bioquímicas específicas, como as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas (SOYBIR, et al. 2011).

O atraso na cicatrização de feridas como consequência das mudanças estruturais e funcionais na pele, relacionadas com a idade, é caracterizado por excessiva resposta inflamatória, proliferação celular de fibroblastos, queratinócitos e macrófagos diminuída e consequente perda dos componentes da matriz extracelular (ASHCROFT; MILLS; 2002; SGONC, GRUBER, 2013).

A reparação tecidual pode ser beneficiada quando se intervém nos principais eventos que a compõe, principalmente quando utilizado desde a fase inicial da cicatrização, pois o controle da inflamação e da proliferação celular, facilitam e aceleram o restante do processo de reparação tecidual.

O LBP tem sido utilizado como coadjuvante na cicatrização, pois seus efeitos biomoduladores, como diminuição do processo inflamatório através da inibição de mediadores químicos da inflamação (FIORIO, et al, 2014; WOODRUFF, et al. 2004), estímulo à microcirculação e formação de novos vasos (PEREIRA, 2005) e aumento da proliferação de fibroblastos (MEDRADO, et al. 2003), com maior deposição total de colágeno (FIORIO, et al. 2014), aceleram o processo de reparo tecidual.

Diante das evidências encontradas na literatura de que o processo de cicatrização no indivíduo idoso é diferente do jovem, neste estudo buscamos analisar a influência do laser na cicatrização observando a participação de citocinas como a interleucina 6 (IL-6), Quimioatraente-1 de neutrófilos indutor de citocina (CINC-1) (um homólogo da IL-8 em humanos) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), das metaloproteinases (MMPs), especificamente a MMP-3 e MMP-9, do inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP-2) e a deposição de colágeno.

Observamos no presente estudo alteração da expressão de todos os marcadores analisados nos três tempos experimentais (3, 7 e 14 dias), mostrando um evidente atraso no processo de cicatrização de feridas dos ratos idosos.

O início do processo de reparação tecidual é marcado pela infiltração de neutrófilos, que tem como função principal a destruição de microorganismos e o debridamento do tecido desvitalizado. Para a realização dessas tarefas, os neutrófilos liberam uma grande quantidade de substâncias antimicrobianas para controlar a inflamação, além de produzirem uma série de citocinas, que induzem a expressão de outras citocinas, quimiocinas e enzimas, como a IL-6, IL-8, VEGF e MMPs, que amplificam e regulam os sinais proliferativos da ferida (HENG, 2011). As citocinas estão envolvidas em diversas atividades biológicas pró-inflamatórias, tais como febre, estimulação da migração de neutrófilos para os tecidos, indução de moléculas de adesão vascular e estimulação da síntese de proteínas de fase aguda (ENGELHARDT et al., 1998).

Os três grupos do nosso estudo mostraram uma maior expressão de IL-6 e CINC-1 (homóloga a IL-8 em humanos) na fase inicial da cicatrização, diminuindo com o tempo. Contudo a expressão estava significativamente maior nos grupos idosos (tratado e controle) comparados ao grupo jovem. O aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e IL-8, em indivíduos idosos também foi encontrado por Sarkar et al. (2006), indicando que o envelhecimento está relacionado a um estado inflamatório crônico. Este estado inflamatório crônico, segundo Ashcroft e Mills (2002), pode ser desencadeado pela diminuição dos níveis de hormônios sexuais masculinos e femininos, os quais em baixas concentrações parecem ter efeitos deletérios na cicatrização de feridas, pois aumentam a resposta inflamatória e reduzem a deposição da matriz.

Apesar da expressão da IL-6 e CINC-1 estar aumentada nos grupos idosos em comparação ao grupo jovem, observa-se que o grupo idoso tratado com LBP teve expressão significativamente menor que o grupo idoso controle. Isso demonstra que o laser foi efetivo na diminuição da expressão desses mediadores inflamatórios.

Este efeito biomodulatório do LBP sobre as citocinas também foi encontrado por outros autores. Alves et al. (2013) avaliaram o efeito do LBP na inflamação articular induzida por papaína em ratos e verificaram que o tratamento laser, reduziu a inflamação celular e diminuiu a expressão de IL-1b e IL-6. Yu et al. (1996) irradiaram culturas de células humanas com o laser vermelho e verificaram aumento da migração e proliferação de queratinócitos, através da diminuição da expressão de IL-8, o que favorece uma reepitelização mais rápida.

A IL-6 é produzida por neutrófilos e é importante na iniciação da resposta de cura; ou seja, a IL-6 têm efeitos mitogênicos e proliferativos em queratinócitos e, ao mesmo tempo, atua como quimioatraente para os neutrófilos (ENGELHARDT et al., 1998). De acordo com Grellner (2002), após uma injúria tecidual, a expressão de IL-6 aumenta já 15 a 20 minutos após a lesão, atingindo seu pico em 24-48 horas, reduzindo gradativamente em 7 dias.

Verificamos que os grupos idosos apresentaram uma superexpressão de IL-6 durante todos os períodos experimentais e mesmo após 14 dias da lesão sua expressão estava significativamente maior comparada ao o grupo jovem no início da fase do reparo, ou seja, os grupos idosos não chegaram a ter expressão de IL-6 próximas aos níveis do grupo jovem em nenhum tempo experimental.

Um fato curioso observado no estudo é que, embora o laser tenha diminuído significativamente a expressão de IL-6 no grupo tratado comparado ao grupo idoso não tratado, a redução foi mais significativa no tempo experimental de 14 dias, onde os níveis de IL-6, caíram para quase a metade dos níveis do grupo não tratado. A expressão aumentada de IL-6 nos grupos idosos e principalmente no grupo não tratado pode estar relacionado ao estado pró-inflamatório crônico inerente ao processo de envelhecimento, que de acordo com Sansoni et al. (2008) os níveis de IL-6 podem alcançar níveis dez vezes maiores no envelhecimento.

Com isso, a modulação precoce dessa citocina pró-inflamatória é essencial, pois sua superexpressão pode atrasar o processo de reparo. Neste sentido o laser favorece a modulação precoce e isso foi encontrado por Lima et al. (2014) os quais relataram que o LBP (GaAlAs, contínuo, 9 mW, 670 nm, 0.031 W/cm^2) diminui significantemente a expressão de IL-6 já em 6 e 12 horas após a lesão induzida.

Do mesmo modo, a modulação de CINC-1 (homólogo a IL-8 em humanos) é importante para o reparo tecidual.

A IL-8 apresenta propriedades quimioatraentes para neutrófilos, participando da resposta inflamatória, estimula diretamente a migração e proliferação de queratinócitos contribuindo para a reepitelização, induz a expressão de metaloproteinases (MMPs) pelos leucócitos (BARRIENTOS et al., 2008), e também apresenta propriedades angiogênicas (ENGELHARDT et al., 1998).

Usando modelo de reparo em pele de humanos adultos, Engelhardt et al,. (1998) investigaram o papel desempenhado pelas quimiocinas na infiltração de leucócitos durante a cicatrização de feridas. No dia 1 após a lesão verificaram que a IL-8 está

maximamente expressada na ferida, estando associada à ativação e infiltração de neutrófilos e, posteriormente diminui sua expressão após o fechamento da ferida no 4º dia.

Os mesmos autores relatam que o *time course* da forte expressão de IL-8 correlaciona-se também com um aumento no número de vasos na área da ferida que ocorre entre os dias 1 e 4, sustentando a importância da IL-8 como mediadora em diferentes etapas da cascata de citocinas durante a cicatrização de feridas em humanos.

Em nosso estudo a CINC-1 apresentou expressão anormalmente alta nos animais idosos, comparada a dos animais jovens em todos os tempos experimentais e, somente a partir do dia 7 os níveis de CINC-1 nos animais idosos tratados começaram a ficar mais próximos dos níveis apresentados pelos animais jovens no 3º dia, demonstrando um atraso na modulação dos níveis dessa citocina nos animais idosos.

Embora o laser tenha diminuído a expressão de IL-6 e CINC-1, os níveis dessas citocinas ainda estavam significativamente maiores em todos os tempos experimentais nos ratos idosos, comparado aos ratos jovens, levando ao prolongamento da fase inflamatória. Esse achado reforça os resultados obtidos por Rambo et al., (2014), que compararam os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF) em animais jovens e idosos que foram submetidos a lesão tecidual e tratamento com laser e estas apresentaram níveis significativamente maiores nos animais idosos e do mesmo modo nos faz pensar que ajustes nos parâmetros da terapia com laser podem refletir em uma melhor modulação dessas citocinas no processo de cicatrização de idosos.

As metaloproteinases (MMPs) também desempenham um importante papel durante todas as fases da cicatrização, pois, ao mesmo tempo que degradam constituintes da matriz extracelular (MEC) danificada, apresentam habilidade para sintetizar colágeno e outros membros da MEC (ARAÚJO et al., 2011; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; RANDALL; HALL, 2004).

Em nosso estudo, tanto a MMP-3 quanto a MMP-9 tiveram expressão significativamente maior nos grupos idosos comparados ao grupo jovem em todas as fases de reparação.

De acordo com Ambrosch, et al. (2013), a expressão das MMPs é regulada por interleucinas, TIMPs e outros fatores. Como em nosso estudo verificamos que nos animais idosos há uma maior expressão dos níveis de CINC-1, isso pode explicar a superexpressão da MMP-3 e MMP-9, já que a IL-8, homólogo humano da CINC-1 induz a expressão de MMPs.

Uma das funções das MMPs é degradar componentes da MEC. A MMP-3 degrada proteoglicanos, fibronectina, colágeno tipo III e IV (NAGASE; VISSE; MURPHY; 2006), enquanto que a MMP-9 atua sobre o colágeno tipo IV, elastina e colágeno desnaturado (SALO et al., 1994). A expressão aumentada dessas MMPs pode destruir fatores pró-cicatrização e componentes da MEC no leito da ferida, alterando o processo cicatricial (GIBSON et al., 2009). Altos níveis de MMPs podem também degradar fatores de crescimento como o PDGF, EGF, VEGF, e consequentemente haverá diminuição ou ausência da proliferação de células essenciais para a substituição tecidual como os fibroblastos que tem função de sintetizar colágeno (BUCALO; EAGLSTEIN; FALANGA, 1993).

De acordo com Ladwig et al., (2002), níveis elevados de MMP-9 diminuem a velocidade do fechamento da ferida, enquanto MMP-3 em excesso pode alterar a estrutura da parede do vaso por meio da degradação de proteínas da matriz extracelular, influenciando na angiogênese (BORGHAEI; SULLIVAN; MOCHAN, 1999).

Com isso, a modulação das MMPs é essencial para o processo de reparação e a terapia com laser de baixa potência mostra-se eficaz nesta modulação.

Observamos em nosso estudo que, embora os animais idosos apresentaram expressão de MMP-3 e MMP-9 maior que os animais jovens, os animais idosos que foram tratados com laser apresentaram expressão significativamente menor que os idosos não tratados, mostrando a capacidade do laser em diminuir a expressão dessas MMPs.

Embora escassos os estudos que avaliam os efeitos do laser sobre as MMPs e cicatrização de idosos, há diversos estudos que apontam o efeito biomodulatório do laser sobre as MMPs.

Alves et al., (2014) investigaram os efeitos do LBP na produção de MMP-2 e MMP-9 em lesão articular induzida por papaina ao longo de 7, 14 e 21 dias e verificaram que a laserterapia a 50 mW reduziu a expressão de MMP-9.

Gigo-Benato et al., (2004) analisaram os efeitos do laser na reparação nervosa e verificaram que o laser (660 nm; 10, 60 e 120 J/cm^2) foi eficaz em aumentar a atividade da MMP-2 nos nervos lesados, podendo facilitar o crescimento axonal, além de diminuir a atividade de MMP-9 nestes nervos,que provavelmente contribuiu para atenuar o processo inflamatório.

Aparecida da Silva; et al. (2013) utilizaram laser (50 mW, 660 nm, de 4 J/cm²), 80 s) na cicatrização de feridas em ratos diabéticos e verificaram que houve redução significativa da expressão de MMP-2 e MMP-9 nos animais tratados.

Ao passo que o laser foi capaz de diminuir a expressão das MMPs nos animais idosos tratados, verificamos que o laser aumentou significativamente a expressão de TIMP-2 nesses animais, comparando com os animais não tratados. Como o TIMP-2, tem função de modular a expressão das MMPs, especialmente da MMP-3, a indução de uma maior expressão do TIMP-2 pelo laser refletiu na diminuição dos níveis de MMPs nos animais idosos tratados.

Variações nos níveis de TIMPs são considerados importantes porque afetam diretamente o nível da atividade de MMPs. Os TIMPs têm sua expressão regulada por vários fatores como as IL-1β, IL-6 e alguns fatores de crescimento (VISSE; NAGASE, 2003), com isso a alteração dos níveis dessas citocinas afetará a expressão dos TIMPs, em especial o TIMP-2 no presente estudo. De acordo com Ladwig et al., (2002), o excesso de IL-6 também leva a uma superexpressão das MMPs. Portanto, com a modulação dos níveis de IL-6 pelo laser nos animais idosos, houve modulação da expressão do TIMP-2, e também das MMPs, sendo esta interleucina importante na modulação da expressão dos níveis de TIMP-2 e MMPs, bem como a modulação do TIMP-2 é importante para a regulação das MMPs. Observa-se com isso que esses biomarcadores formam uma orquestra organizada no processo de reparação tecidual.

A angiogênese é outro processo complexo que tem um papel fundamental na cicatrização de feridas; é um processo fisiológico que envolve a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese na cicatrização de feridas envolve vários passos, incluindo a vasodilatação, degradação da membrana basal e migração e proliferação de células endoteliais; em seguida ocorre a formação do tubo capilar, seguida de anastomose paralela de brotos capilares formando uma malha, e, finalmente, a formação de membrana basal nova (BAO et al., 2009).

Das várias substâncias pró-angiogênicas a que mais se destaca é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Ele induz a liberação de fatores pró-coagulantes que medeiam a adesão e agregação plaquetária, estimula a expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-9, que terão papel na degradação da matriz extracelular e induz a migração de células endoteliais através da quimiotaxia e aumento da permeabilidade vascular mediada por NO e prostaciclina, onde o vazamento da fibrinogênio do plasma e a sua subsequente conversão em um gel de fibrina no espaço

extracelular estimula a migração endotelial e a germinação de novos vasos (YOSHIDA; ANAND-APTE; ZETTER, 1996; BAO et al., 2009).

Diante das propriedades do VEGF, observa-se que ele desempenha um importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição nos seus níveis ou sua ausência, quanto o aumento provocam danos na formação vascular (FÁTIMA; PAPA, 2010).

No envelhecimento, a diminuição da perfusão tecidual induzida pela idade compromete a angiogênese e consequentemente afeta a cicatrização de feridas (SOYBIR et al., 2012).

O VEGF é expressado por queratinócitos já no primeiro dia da lesão. A expressão de VEGF ao longo do tempo fornece *insights* sobre a progressão da cicatrização de feridas. A atividade máxima, onde o crescimento e diferenciação capilar estão no máximo, ocorre durante o período de aproximadamente 3 a 7 dias após a lesão, o que coincide com a fase de proliferação. Uma vez que a ferida é granulada, a angiogênese diminui à medida que as células endoteliais sofrem apoptose (BAO et al., 2009).

Em nosso estudo observamos que os níveis de VEGF estavam significativamente diminuídos nos animais idosos em relação aos animais jovens no 3º e 7º dia após a lesão, comprometendo a angiogênese, embora o laser minimizou esta diminuição nos animais tratados.

No grupo idoso não tratado, observa-se que os níveis de VEGF no 14º dia aumentaram em comparação ao 3º e 7º dia, curso inverso do processo fisiológico, onde os níveis de VEGF estão aumentados nas fases inicias da cicatrização, com diminuição ao longo do processo cicatricial. Isso nos leva a acreditar no atraso do processo de cicatrização destes animais, já que o VEGF é um fator determinante para a diferenciação de células endoteliais e para o desenvolvimento de vascularização na área ferida. Hayashi e seus colegas (2004) mostraram que uma taxa positiva de VEGF > 50%, possivelmente indica uma idade ferida perto de 21 dias, ou seja, quanto maiores os níveis de VEGF ao longo do tempo, maior é o atraso na cicatrização das feridas.

Os resultados do nosso estudo mostram que o laser aumentou a expressão do VEGF nos animais idosos, fazendo com que o curso dessa expressão se aproximasse ao curso da expressão nos animais jovens nos dias 3 e 7 e no dia 14 a expressão nos dois grupos (idoso tratado e jovem) se equiparou, não mostrando alteração significativa.

Nossos resultados são similares aos obtidos por Colombo e colaboradores (2013), que investigaram a angiogênese em feridas cutâneas de ratos adultos jovens. Eles

irradiaram as feridas com laser (λ660 nm, 16 mW, 10 J/cm^2) imediatamente após a indução das feridas e repetiram durante 6 dias, concluindo que o tratamento com laser contribuiu para o aumento da angiogênese.

Cury et al., (2013) irradiaram feridas com laser em dois comprimentos de onda, 660 e 780 nm, utilizando doses de 30 e 40 J/cm^2, durante 4 dias consecutivos após a cirurgia, e investigaram os efeitos da LLLT na expressão gênica de VEGF. Verificaram que ambos os comprimentos de onda utilizados foram capazes de alterar a expressão gênica de VEGF, que culminou com um aumento na quantidade de novos vasos sanguíneos.

Szymanska et al., (2013) avaliaram a influência do laser (λ635 nm) na proliferação de células endoteliais vasculares in vitro e na secreção de VEGF e concluíram que a terapia com laser aumenta a proliferação de células endoteliais. O aumento significativo na proliferação de células endoteliais e correspondente diminuição da concentração de VEGF pode sugerir o papel de VEGF no processo de cura em feridas de difícil cicatrização.

Diante disso, observa-se a importância de modular a expressão de VEGF durante o processo cicatricial, pois, de acordo com Fátima e Papa (2010), níveis reduzidos de VEGF podem contribuir para a presença de feridas crônicas de difícil cicatrização, enquanto níveis aumentados de VEGF podem contribuir para o desenvolvimento de uma cicatriz hipertrófica, com número de vasos aumentados e consequente edema tissular.

A maior importância da angiogênese no processo cicatricial está relacionada a restauração dos níveis oxigênio e nutrientes para o tecido formado, favorecendo a síntese de proteínas, bem como a proliferação e migração celular, tais como fibroblastos, que tem como função sintetizar colágeno (COLOMBO et al., 2013).

O colágeno é uma proteína de grande importância na arquitetura tecidual, pois está organizado de tal maneira que ao mesmo tempo que permite flexibilidade, apresenta grande força tênsil nos tecidos, protegendo-os das agressões mecânicas que provocam falta de continuidade ao tecido (VELASCO et al., 2004).

Existem diversos tipos de colágeno, contudo, a proporção do tipo de colágeno existente em um tecido depende da especificidade deste e o tamanho das fibrilas de colágeno é um fator importante para determinar a natureza física do tecido (HARRIS, 2005). Na matriz dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: tipo I e tipo III, correspondendo respectivamente a cerca de 80-85% e 15-20% do total desta proteína. O

colágeno do tipo I é o principal componente estrutural da MEC e responsável pela manutenção da estrutura da derme (JUNG et al., 2007).

Em uma lesão tecidual, a degradação do colágeno se inicia precocemente, sendo muito ativa durante o processo inflamatório. No início do reparo, ao mesmo tempo em que ocorre a degradação de colágeno I (mais abundante na pele sã), ocorre também a síntese de colágeno III sendo este processo estimulado pelo PDGF. Contudo, concomitantemente, ocorre a secreção de TGF-β que induz maior secreção do colágeno I e sua menor degradação por aumento da expressão de TIMPs e menor expressão de MMPs, sendo a remodelagem e a contração da ferida parcialmente controladas pela relação entre eles (JUNG et al., 2007; BROUGHTON, 2006).

Com o envelhecimento, a pele do idoso encontra-se com redução da proliferação e motilidade dos fibroblastos, os quais são responsáveis por sintetizar colágeno (MAKRANTONAKY; ZOUBOULIS, 2008).

Observamos em nosso estudo que a expressão de colágeno nos grupos idosos, tanto do tipo I quanto do tipo III apresentou um curso diferente da expressão do colágeno nos animais jovens. Nos animais jovens houve maior expressão de colágeno III e consequentemente menor expressão de colágeno I nas fases inicias da cicatrização, e nas fases mais tardias houve aumento da expressão de colágeno I e diminuição do colágeno III. Os grupos idosos apresentaram expressão do colágeno I significativamente maior que os animais jovens nos dias 3 e 7, e em 14 dias a expressão estava significativamente menor que a expressão nos animais jovens. Em relação ao colágeno III, os grupos idosos apresentaram expressão significativamente menor que o grupo jovem em 3 e 7 dias, enquanto que em 14 dias apresentaram expressão significativamente maior que os animais jovens. Isso demonstra um atraso na deposição dos colágenos nos animais idosos.

Contudo o laser foi capaz de reduzir esse atraso nos animais idosos tratados, especialmente na deposição do colágeno III nas fases iniciais de reparação e na deposição do colágeno I aos 14 dias após a lesão, fazendo com que a expressão de colágeno no grupo idoso tratado se comportasse de maneira mais semelhante aos animais jovens, embora com significativa diferença em relação a esses animais.

O aumento da deposição de colágeno III no início do processo cicatricial com o uso do LBP também foi encontrado por Biondo-Simões e Busnardo (2010), com aumento da deposição do colágeno III no 3º dia pós-operatório.

A menor deposição de colágeno nos animais idosos pode estar relacionada a diminuição do número de fibroblastos e aumento do infiltrado inflamatório encontrados na pele envelhecida (WULF et al., 2004), pois, como os fibroblastos sintetizam colágeno, se eles se encontram em menor quantidade na pele do idoso, consequentemente haverá menor de deposição de colágeno durante a cicatrização, contudo o LBP auxiliou na deposição do colágeno.

Isto pode er explicado pelo fato de que o laser auxilia na proliferação de fibroblastos (RAMBO et al., 2014), sendo assim, haverá maior deposição do colágeno.

A migração dos fibroblastos é estimulada pela secreção das MMPs, que acontecem durante todas as fases da cicatrização (PARKS, 1999). Baseando-se nessas informações, observa-se que o comportamento das MMPs está diretamente relacionado à deposição de colágeno.

Na fase inicial da cicatrização, as MMPs decompõem a MEC danificada que ocorre no leito da lesão, permitindo que os novos componentes da MEC como o colágeno, a fibronectina e os proteoglicanos que são sintetizados pelas células das feridas se integrem de maneira adequada aos componentes intactos da MEC nos rebordos das feridas (McCAW; EWALD; WERB, 2007). A superexpressão de MMPs em todas as fases do processo, verificada nos animais idosos do nosso estudo, podem explicar também a alteração da deposição do colágeno, pois quando superexpressadas podem degradar componentes da MEC essenciais para a deposição do colágeno. Contudo, a modulação das MMPs pelo laser nos animais idosos, favoreceu a deposição desses colágenos nesses animais.

Outros autores também encontraram melhor deposição de colágeno com a utilização do laser.

Carvalho et al., (2003) realizaram análise do percentual das fibras colágenas, em cicatrizes tratadas com laser HeNe com dosagem de 4 J/cm2 e constataram aumento significativo no percentual de colágeno do 3º ao 7º dia.

Carvalho et al., (2006) também demonstraram que a aplicação do *laser* HeNe de baixa intensidade (632,8 nm) promovia um aumento na porcentagem de colágeno em feridas de pele de ratos diabéticos através do aumento da quantidade de fibras de colágeno, processo semelhante ao observado em animais não diabéticos, indicando eficácia dos efeitos do laser no processo de cicatrização.

Aparecida da Silva et al., (2013) avaliaram os efeitos biomodulatórios da MMP-2 e MMP-9 e distribuição de colágeno em feridas de ratos diabéticos e verificaram que

o LLLT foi capaz de alterar a expressão de MMP-9, bem como acelerar a produção de colágeno e aumentar a percentagem total de colágeno de tipo III em animais diabéticos.

De acordo com os resultados encontrados em nossa pesquisa, mesmo que os processos fisiológicos estejam diminuídos na pele envelhecida, esta respondeu satisfatoriamente à terapia laser de baixa potência, apresentando uma cicatrização mais semelhante à cicatrização da pele jovem.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, observamos que embora, na pele envelhecida há atraso no processo de reparação tecidual, uma vez que a expressão de IL-6, CINC-1, VEGF, MMP-3, MMP-9, TIMP-2 e colágenos I e III, se apresentou de forma diferente que nas peles jovens, o laser mostrou-se eficaz na modulação desses mediadores do processo cicatricial.

Observamos que o laser diminuiu os níveis das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8, melhorando a inflamação; diminuiu os níveis de MMP-3 e MMP-9, com consequente aumento dos níveis de TIMP-2; aumentou os níveis de VEGF na fase inicial do reparo, favorecendo a angiogênese e modulando todos esses mediadores favoreceu a deposição de colágeno tipo I e tipo III, mostrando com isso os esforços coordenados desses mediadores para o processo de reparação.

Concluímos com esses resultados que o laser (λ660 nm, 30 mW (densidade de potência de 1,07 W/cm2, 2J) melhora o processo de cicatrização de feridas de idosos.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.; BJORDAL, J.M.; ALVES, L.P.; MUNIN, E.; COSTA, M.S. Anti-inflamatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 50-55, 2007.

ALVES, A.C.; VIEIRA, R.; LEAL-JUNIOR, E.; DOS SANTOS, S.; LIGEIRO, A.P.; ALBERTINI, R.; JUNIOR, J.; DE CARVALHO, P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther,** v.15, n. 5, p. 116, 2013.

AL-WATBAN, F.A.H.; ANDRES, B.L.; Laser photons and pharmacological treatments in wound healing. **Laser Therapy**, v. 12, p. 1-9, 2001.

AMBROSCH, A.; HALEVY, D.; FWITY, B.; BRIN, T.; LOBMANN, R. Effect of daptomycin on local interleukin-6, matrix metalloproteinase-9, and metallopeptidase inhibitor 1 in patients with MRSA-Infected diabetic foot. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 12, n. 2, p. 100, 2013.

ALVES, A.C.A.; ALBERTINI, R.; DOS SANTOS, S.A.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; SANTANA, E.; SERRA, A.J.; SILVA JR, J.A.; DE CARVALHO, P.de T. C. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. **Lasers in medical science**, v. 29, n.3, p. 911-919, 2014.

DA SILVA, A.; LEAL-JUNIOR, E. C.; ALVES, A.C.; RAMBO, C.S.; DOS SANTOS, S.A.; VIEIRA, R.P.; DE CARVALHO, P. T. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **J Cosmet Laser Ther**,

ARAÚJO, R.V.de S.; SILVA, F.O.; MELO-JÚNIOR, M.R.; PORTO, A.L.F. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **R. Ci. md. biol**., Salvador, v.10, n.1, p. 82-88, jan./abr. 2011.

ARUMUGAM, S.; JANG, Y.C.; CHEN-JENSEN, C.; GIBRAN, N.S.; ISIK, F.F. Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. **Surgery**, v. 125, p. 587, 1999.

ASHCROFT, G.S.; MILLS, S.J.; ASHWORTH, J.J.; Aging and wound healing. **Biogerontology**, n.3, p. 337–45, 2002.

ASHCROFT, G.S.; HORAN, M.A.; HERRICK, S.E.; TARNUZZER, R.W.; SCHULTZ, G.S.; FERGUSON, M.W. Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds in healthy humans. **Cell Tissue Res**, v. 290, n. 3, p. 581-91, 1997.

ASHCROFT, G. S.; MILLS, S. J. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. **J Clin Invest**. V. 110, n. 3, p. 615-624, 2002.

ASHCROFT, G.S.; HORAN, M.A.; FERGUSON, M.W. Aging alters the inflammatory and endothelial cell adhesion molecule profiles during human cutaneous wound healing. **Lab Invest**, v. 78, p. 47-58, 1998.

BAILEY, A.J. Molecular mechanisms of aging in connective tissues. **Mech Ageing Dev**., v. 122, p. 735-755, 2001.

BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M.; GOLINKO, M.S.; EHRLICH, P.; BREM, H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **J Surg Res**, v. 153, n. 2, p. 347-358, 15 may. 2009.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M.S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound heling. **Wound repais and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, set/out. 2008.

BELLAYR, I.H.; MU, X.; LI, Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. **Future Med Chem**, v. 1, n. 6, p. 1095-111, 2009.

BILATE, A.M.B. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 3, p. 86-90, set. 2007.

BIONDO-SIMÕES, M.de L.P.; IOSHIIII, S.O.; ZAZULAIII, A.D.; BIONDO-SIMÕES. O processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento: estudo da cicatrização de anastomoses intestinais, em ratos. **Acta Cir. Bras**., São Paulo, 2005.

BORGHAEI, R.C.; SULLIVAN, C.; MOCHAN, E. Identification of a cytokine-induced repressor of interleukin-1 stimulated expression of stromelysin MMP-3. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 2126-2131, 1991.

BORKAKOTI, N. Structural studies of matrix metalloproteinases. **Journal of Molecular Medicine,** v. 78, n. 5, p. 261-268, jul. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Núcleo de Apoio à Saúde da Família / Ministério da Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 116 p.

BROOKS, D.E.; OLLIVIER, F.J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract**., v. 34, p. 611-22, 2004.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast. Reconstr. Surg.,** v. 117, n. 7, p. 1-32, 2006.

BUCALO, B.; EAGLSTEIN, W.; FALANGA, V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. **Wound Rep. Reg**., v. 1, p. 181-186, 1993.

BUSNARDO, V.L.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Rev. bras. fisioter**., v.14, n.1, p. 45-51, 2010.

CAMPOS, A. C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.

CARVALHO, P.T.C.; MAZZER, N.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.; SILVA, I.S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta. Cir. Bras.**, v. 21, n. 3, 2006.

CARVALHO, P.T.C.; MAZZER, N.; SIQUEIRA, J.F.; FERREIRA, V.J.; SILVA, I.S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Fisoter. Bras.**, v. 4, n. 4, p. 253-8, 2003.

CHEN, W.; FU, X.; GE, S.; SUN, T.; SHENG, Z. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. **Int. j. biochem. cell biol.**, Exeter, v. 39, n. 5, p. 997-1005, 2007.

CHYUN, J.H.; GRIMINGER, P. Improvement of nitrogen retention by arginine and glycine supplementation and its relation to collagen synthesis in traumatized mature and aged rats. **J Nutr**, v. 114, n. 9, p. 1697-704, 1984.

COLOMBO, F.; NETO A.A.; SOUSA, A.P.; MARCHIONNI, A.M.; PINHEIRO, A.L.; REIS, S.R. Effect of low-level laser therapy (λ660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. **Braz. Dent. J.** v. 24, n. 4, p. 308-12, 2013.

CULLEN, B.; SMITH, R.; MCCULLOCH, E.; SILCOCK, D.; MORRISON, L. Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. **Wound Repair and Regeneration,** v. 10, p. 16-25, 2002.

CURY, V.; MORETTI, A.I.S.; ASSIS, L.; BOSSINI, P.; CRUSCA, J.S.; BENATTI NETO, C.; FANGEL, R.; SOUZA, H.P.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1a and MMP-2. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v.125, p. 164-170, 2013.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.

EBRAHEM, Q.; CHAURASIA, S.S.; VASANJI A.; QI, J.H.; KLENOTIC, P.A.; CUTLER, A.; ASOSINGH, K.; ERZURUM, S.; ANAND-APTE, B. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization in vivo. **Am. J. Pathol**., v. 176, p. 496-503, 2010.

ENGELHARDT, E.; TOKSOY, A.; GOEBELER, M.; DEBUS, S.; BRÖCKER, E.B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially

and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. **Am. J. Pathol.**, v. 153, n. 6, p. 1849-60, dez.1998.

ENWEMEKA, C.S.; PARKER, J.C.; DOWDY, D.S.; HARKNESS, E.E.; SANFORD, L.E.; WOODRUFF, L.D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed Laser Surg.,** v. 22, p. 323-329, 2004.

FAZIO, M.J.; ZITELLI, J.A.; GOSLEN, J.B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN III, W.P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. **Cirurgia Cosmética:** Princípios e Técnicas. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 23-28 p.

FIÓRIO, F.B.; ALBERTINI, R.; LEAL-JUNIOR, E.C.; DE CARVALHO. P.de T. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science,** v. 29, p. 313-319, 2014.

FIÓRIO, F.B.; SILVEIRA JUNIOR, L.; MUNIN, E.; DE LIMA, C.J.; FERNANDES, K.P.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; DE CARVALHO P.de T.; LOPES-MARTINS, R.A.; AIMBIRE, F.; DE CARVALHO, R.A. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. Journal of cutaneous laser therapy **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 13, p. 315-322, 2011.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10931-4, 1992.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N. Engl. J. Med**., v. 340, n. 6, p. 448-54, fev. 1999.

GAVISH, L.; PEREZ, L.; GERTZ, S.D. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. **Lasers Surg Med**., v.38, p. 779-786, 2006.

GENOVESE, J.W. **Laser de baixa intensidade:** aplicações terapêuticas na odontologia. São Paulo: Lovise, 2000.

GIBSON, D.; CULLEN, B.; LEGERSTEE, R.; HARDING, K.G.; SCHULTZ, G. MMPs Made Easy. **Wounds International**, v. 1, n.1, 2009. Disponível em <http://www.woundsinternational.com. > Acesso em: 10 de Ago de 2014

GIGO-BENATO, D.; GEUMA, S.; RODRIGUES, A.C.; TOS, P.; FORNARO, M.; BOUX, E. et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. **Lasers Med. Sci**., v. 19, p.57-65, 2004.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J. Leukoc. Biol.**, Winston-Salem, v. 69, n. 4, p. 513-520, 2001.

GOLDFEDER, E.M. et al; **Envelhecimento Normal**. Santa Catarina. 2005. Disponível em: <http://www.ccb.ufsc.br/~cristina/sm_2005_1_med7002.htm> Acesso em 05 set. 2014.

GONÇALVES, R.V.; NOVAES, R.D.; MATTA, S.L.; BENEVIDES, G.P.; FARIA, F.R.; PINTO, M.V. Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wounds in wistar rats: a histomorphometric study. **Photomed Laser Surg**., v. 28, n.5, p. 597-602, out. 2010.

GRELLNER, W. Time-dependet immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) in human skin wounds. **Forensic Science International**, v.130, p. 90-96, 2002.

GRELLNER, W.; GEORG, T.; WILSKE, J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. **Forensic Science International,** v. 113, p. 251-64, 2000.

GUYURON, B.; JOHN, P.; CHUNG, K.; ARUN, G.; KINNEY, B.; RUBIN, J.P. **Plastic surgery:** indications and practice. St Louis, MO: Elsevier; 2009. p. 9-26.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele:** estrutura, propriedades e envelhecimento. 2ª ed. Ed. Senac, São Paulo, 2005

HAWKING-EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of mutiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblast. **Photomed Laser Surg.,** v. 24, n. 6, p. 705-714, 2006.

HAYASHI, T.; ISHIDA, Y.; KIMURA, A.; TAKAYASU, T.; EISENMENGER, W.; KONDO, T. Forensic application of VEGF expression to skin wound age determination. **Int. J. Legal. Med**., v. 118, p 320-5, 2004.

HENG, M. C. Y. Wound healling in adult skin:aiming for perfect regeneration. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n.9, p. 1058-1066, 2011.

HOSAKA, Y.; KIRISAWA, R.; UEDA, H.; YAMAGUCHI, M.; TAKEHANA, K. Differences in tumor necrosis factor (TNF)alpha and TNF receptor-1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons. **J Vet Med Sci,** v. 67, n.10, p. 985-991, 2005.

INOE, A.P.; ZAFANELLI, C.C.G.; ROSSATO, R.M.; LEME, M.C.; SANCHES, A.W.D.; ARAÚJO, C.V. et al. Avaliação morfológica do efeito do laser de baixa potência He-Ne em feridas cutâneas de coelhos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.,** Unipar, v. 11, n. 1, p. 27-30, 2008.

JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. **Advances in Wound Care.,** v. 3, n. 10, p. 647-661, out. 2014.

JULIA, V.; ALBERT, A.; MORALES, L.; MIRO, D.; BOMBI, J.; SANCHO, A. Características de la cicatrización de las heridas en el período fetal. **Cir. Pediatr.,** v. 5, n. 3, p. 117-21, 1992.

JUNG, E.; LEE, J.; BAEK, J.; JUNG, K.; LEE, J.; HUH, S.; KIM, S.; KOH, J.; PARK, D. Effect of Camellia japonica oil on human tipe I procollagen production and skin barrier function. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 127-131, 2007.

KARU, T. Cellular mechanisms of low-power laser therapy. **Advanced Energy Medicine**, 2006. Disponível em < http://www.tinnitus.us/tinakarupresentation, htmlwww.tinnitus.us/tinakarupresentation.html > Acesso em: 23 de Ago de 2014.

KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. São Paulo: Atheneu, 2004.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.170.

KNAUPER, V.; BAILEY, L.; WORLEY, J.R.; SOLOWAY, P.; PATTERSON, M.; MURPHY, G. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. **FEBS Lett**, v. 532, p. 127-130, 2002.

LADWIG, G.P.; ROBSON, M.C.; LIU, R.; KUHN, M.A.; MUIR, D.F.; SCHULTZ, G.S. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. **Wound Repair Regen,** v. 10, n. 1, p. 26-37, 2002.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de Feridas. **Revista da SPDV,** v. 69, n. 3, 2011.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing**. Clin Dermatol**., v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LIMA, A.A.; SPÍNOLA, L.G.; BACCAN, G.; CORREIA, K.; OLIVA, M.; VASCONCELOS, J.F.; SOARES, M.B.; REIS, S.R.; MEDRADO, A.P. Evaluation of corticosterone and IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. **Lasers Med. Sci**., v. 29, p. 709-715, 2014.

LOBMANN, R.; AMBROSCH, A.; SCHULTZ, G.; WALDMANN, K.; SCHIWECK, S.; LEHNERT, H. Expression of matrixmetalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, Berlin, v. 45, p. 1011-1016, 2002.

DE FÁTIMA, L.A.; PAPA, P.de C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia,** p. 4-22, 2010.

MAFRA DE LIMA, F.; VILLAVERDE, A.B.; SALGADO, M.A.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MUNIN, E.; ARBERTINI, R.; AMBIRE, F. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from Escherichia coli in rat. **J. Photochem. Photobiol**., v. 101, n. 3, p. 271-8, 2010.

MAGGIO, M.; GURALNIK, J.M.; LONGO, D.L.; FERRUCCI, L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. **Journal of Gerontology Medical Sciences**, v. 61, n. 6, p.575-84, 2006.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. Skin alterations and diseases in advantage age. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n.2, p. 153-162, 2008.

McCAW, A. P.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.,** v. 8, n. 3, p. 221-33, 2007.

MEDRADO, A. R.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med.**, New York, v. 32, no. 3, p. 29-44, aug. 2003.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**., v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MIRZA, R.; DiPIETRO, L.A.; KOH, T.J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **Am. J. Pathol.,** v. 175, p. 2454-2462, 2009.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research,** v. 69, p. 562-573, 2006.

NAGASE, H.; WOESSNER JUNIOR, J. F.; Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem**. v. 274, n. 31, p. 21491-4, 1999.

O'MALLEY, K.; MOLDAWER, L. Interleukin-6: Still crazy after all these years. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p.2690-2691, oct. 2006.

OLIVEIRA, F.S.; PINFILDI, C.E.; PARIZOTO, N.A.; LIEBANO, R.E.; BOSSINI, P.S.; GARCIA, E.B.; FERREIRA, L.M. Effect of low level laser therapy (830nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. **Lasers Surg. Med.,** v. 41, n. 4, p. 271-276, 2009.

OPLANDER, C.; HIDDING, S.; WERNERS, F.B.; BORN, M.; PALLUA, N.; SUSCHEK, C.V. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. **J Photochem Photobiol. B**., v. 103, n. 2, p. 118-25, 3 may. 2011.

PARK; J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am. J. Surg**., v. 187, p. 11-6, 2204.

PARKS, W.C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair Regen**, v. 7, n. 6, p. 423-32, 1991.

PEREIRA, R.M. **Efeitos de lasers de baixa potência em três diferentes comprimentos de onda no processo de cicatrização de queimaduras de 3º grau**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, Paraíba, 2005.

RA, H.J.; PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol.**, v. 26, n. 8, p. 587-596, 2007.

RAJA; SIVAMANI, K.; GARCIA, M.S.; ISSEROFF, R.R. Wound reepithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Front Biosci**., v. 12, p. 2849-68, 2007.

RAMBO, C.S.M.; SILVA JUNIOR, J.A.; SERRA, A.J.; LIGEIRO, A.P.; DE PAULA, V.R.; ALBERTINI, R.; LEAL-JUNIOR, E.C.; DE TARSO, C.de C.P. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. **Lasers Med. Sci**., 7 may. 2014.

RANDALL, L.E.; HALL, R.C. Temperospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. **Connect Tissue Res**., v. 43, p. 205-211, 2002.

RANGARAJ, A.; HARDING, K.; LEAPER, D. Role of collagen on wound management. **Wounds UK**., v. 7, n. 2, 2011.

RESENDE, D.M.; BACHION, M.M.; ARAÚJO, L.A.O. Integridade da pele prejudicada em idosos: estudo de ocorrência numa comunidade atendida pelo Programa de Saúde da Família. **Acta Paul. Enferm.**, v. 19, n. 2, p. 168-73, 2006.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Patologia**: Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Esevier, 2010.

ROBERTS, E.de. **Bases da Biologia celular e molecular:** matriz extracelular. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

ROCHA JÚNIOR, A.M.; DE OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; DE ANDRADE, L.C.F.; AARESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An Bras Dermatol**., v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D.G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. **Lasers Surg. Med**., v. 9, p. 174-184, 1989.

SALO, T.; MÄKELÄ, M.; KYLMÄNIEMI, M.; AUTIO-HARMAINEN, H.; LARJAVA, H. Expression of matriz melatalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. **Lab Invest,** p. 70-176, 1994.

SANSONI, P.; VESCOVINI, R.; FAGNONI, F.; BIASINI, C.; ZANNI, F.; ZANLARI, L.; TELERA, A.; LUCCHINI, G.; PASSERI, G.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C.; PASSERI, M. The immune system in extreme longevity. **Experimental Gerontology**, v. 43, n. 2, p. 61065, 2008.

SARKAR, D.; FISHER, P.B. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. **Cancer Lett**., v. 236, n. 1, p. 13-23, 8 may. 2006.

SHIN, M.H.; RHIE, G.; PARK, C.; KIM, K.H.; CHO, K.H.; EUN, H.C.; CHUNG, J.H. Modulation of Collagen Metabolism by the Topical Application of Dehydroepiandrosterone to Human Skin. **Journal Investigative Dermatology**, v. 124, p. 315 –323, 2005.

SINGER, A.D.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New Engl J Med**., v. 341, p. 738-46, 1999.

SIVAK, J.M.; FINI, M.E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Prog Retin Eye Res**., v. 21, p.1-14, 2002.

SOYBIR, O.C.; GÜRDAL, S.Ö.; ORAN, E.Ş.; TÜLÜBAŞ, F.; YÜKSEL, M.; AKYILDIZ, A.İ.; BILIR, A.; SOYBIR, G.R. Delayed cutaneous wound healing in aged rats compared to younger ones. **Int. Wound J**., v. 9, n. 5, p. 478-84, 2012.

SWIFT, M.E.; BURNS, A.L.; GRAY, K.L.; Di PIETRO, L.A. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. **J. Invest. Dermatol**., v. 117, n. 5, p. 1027-35, nov. 2001.

SZYMANSKA, J.; GORALCZYK. K.; KLAWE, J.J.; LUKOWICZ, M.; MICHALSKA, M.; GORALCZYK, B.; ZALEWSKI, P.; NEWTON, J.L.; GRYKO, L.; ZAJAC, A.; ROSC, D. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 64, n. 3, p. 387-91, 2013.

TACON, K.C.; SANTOS, H.C.; PARENTE, L.M.; CUNHA, L.C.; LINO-JÚNIOR, Rde. S.; RIBEIRO-ROTTA, R.F.; TACON, F.S.; AMARAL, W.N. Healing activity of laser InGaAlP (660nm) in rats. **Acta. Cir. Bras**., v. 26, n. 5, p.373-8, out. 2011.

ULRICH, D.; ULRICH, F.; UNGLAUB, F.; PIATKOWSKI, A.; PALLUA, N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. **J. Plast. Reconstr. Aesthet Surg,** 2009.

VASTO, S.; CANDORE, G.; BALISTRERI, C.R.; CARUSO, M.; COLONNA-ROMANO, G.; GRIMALDI, M.P.; LISTI, F.; NUZZO, D.; LIO, D.; CARUSO, C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mech Ageing Dev.**, v. 128, p. 83-91, 2007.

VELASCO, M. V. R.; OKUBO F. R.; RIBEIRO M. E.; STEINER D.; BEDIN V. Rejuvenescimento da Pele por Peeling Químico: Enfoque no Peeling de Fenol. **An. Bras. Dermatol**., v. 79, n.1, p. 91-99, Rio de Janeiro, jan/fev. 2004.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Cir. Res.**, v. 92, p. 827-39, 2003.

ZAGORSKI. J.; DELARCO, J.E. Rat CINC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) is the homolog of the human GRO proteins but is encoded by a single gene. **Biochem Biophys Res Commun**., v.190, n.1, p. 104-110, 1993.

WERNER, S.; GROSE, R: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev**., v. 83, n. 835, 2003.

WOODRUFF, L,D.; BOUNKEO, J.M.; BRANNON, W.M.; DAWES, K.S.; BARHAM, C.D.; WADDELL, D.L.; ENWEMEKA, C.S.; The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg.**, v. 22, n.3, p. 241-7, 2004.

WULF, H.C.; SANDBY-MØLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v. 35, p.185-191, 2004.

YAN, C.; BOYD, D.D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J. Cell Physiol.**, v.211, p.19-26, 2007.

YOSHIBA, N.; YOSHIBA, K.; STOETZEL, C.; PERRIN-SCHMITT, F.; CAM, Y.; RUCH, J.V.; LESO, H. Temporal gene expression and protein localization of matrix metalloproteinase and their inhibitors during mouse molar tooth development. **Dev Dyn**., v. 288, p. 105-123, 2003.

YOSHIDA, A.; ANAND-APTE, B.; ZETTER, B.R. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. **Growth Factors**, v. 13, p. 57-64, 1996.

YOUNG, P.; GRINNELL, F. Metalloproteinase activation cascade after burn injury: A longitudinal analysis of the human wound environment. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 660-664, 1994.

YU, H.S.; CHANG, K.L.; YU, C.L.; CHEN, J.W.; CHEN, G.S. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 107, n. 4, p. 593-6, 1996.

ANEXO 1 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Wound Repair and Regeneration

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Wound Repair and Regeneration*.

Manuscript ID:	WRR-14-11-0345
Title:	Low level laser therapy in wound-repair process in aged rats
Authors:	Fiorio, Franciane de Melo Rambo, Caroline Dalbosco, Camila dos Santos, Andrey De Melo, Brunno Abertini, Regiane Leal-Junior, Ernesto Cesar Carvalho, Paulo
Date Submitted:	29-Nov-2014

Print Return to Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

@ScholarOneNews | System Requirements | Privacy Statement | Terms of Use

ANEXO 2 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

UNINOVE
Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0028.2014

Título do Projeto: Análise comparativa da ação do laser de baixa potência sobre biomarcadores inflamatórios e colágeno durante o processo de reparação de feridas cutâneas induzidas em ratos jovens e idosos

Orientador: Paulo de Tarso Camilo de Carvalho

Aluno: Franciane Barbieri Fiório

Objetivos:

OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o efeito da Terapia Laser de Baixa Potência na cicatrização jovem e tardia em um modelo experimental de feridas cutâneas em ratos jovens e idosos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito do Laser de Baixa Potência em quantificação e diferenciação de fibras colágenas do tipo I e tipo III;

Avaliar os efeitos do Laser de baixa potência na expressão proteica de colágeno tipo I e tipo III;

Analisar os efeitos do Laser de baixa potência sobre a expressão proteica das Metaloproteínases (MMP- 3 e MMP-9) TIMP 2

Método:

A ferida cutânea será produzida no dorso do animal utilizando um "punch" de 8mm de diâmetro, permitindo a remoção de uma área circular da pele. Serão utilizados 60 ratos, machos, dos quais serão 30 jovens (± 30 dias) e 30 idosos (±500 dias), distribuídos em quatro grupos experimentais, que serão submetidos à ferida cutânea, onde 2 grupos (1 jovem e 1 idoso) receberá tratamento com Laser de baixa potência (potência de 30 mW, densidade de potência de 1,07 W/cm2), área do feixe de 0,028cm^2, e comprimento de onda de λ 660nm, meio ativo de Fosfeto Indio-Gálio-Alumínio (InGaAlP). A aplicação dar-se-á sob forma de um único ponto pelo método transcutâneo; com energia total de 2 joules, densidade de energia de 72 J/cm2, tempo de 1min e 07 segundos. Serão realizadas análises para verificar os efeitos do LBP sobre a quantificação e diferenciação de fibras colágenas do Tipo I e tipo III; sobre a expressão proteica de colágeno tipo I e III, Metaloproteinases MMP-3 e MMP-9, TIMP 2

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Rato heterogênico	*Wistar*	Jovem (30 dias	130 - 150g	30		
	Wistar	Idosos (500 dias)	400 – 450g	30		
				TOTAL:		60

Condições de alojamento e nutrição:

- Alimentação – à vontade
- Fonte de água – à vontade
- Lotação - Número de animais/área – 5 animais por caixa apropriada (41x34x16cm) de polipropileno.
- Exaustão do ar: sim

Ficarão alocados no biotério de passagem da UNINOVE, antes de se iniciarem os experimentos os animais passarão por fase de ambientação de uma semana, em um ciclo de claro e escuro de 12 horas, temperatura controlada, com alimentação e água à vontade.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:

Não haverá estresse. A dor referente aos procedimentos experimentais será tratada com medicamento analgésico

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

Fármaco	Ketamina
Dose (UI ou mg/kg)	87 mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal

Fármaco	Xilasina
Dose (UI ou mg/kg)	13 mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal

Fármaco	Tramal
Dose (UI ou mg/kg)	5mg/kg
Via de administração	Intraperitoneal
Frequência	Por 2 dias após a indução da contusão, a cada 4 horas.

Eutanásia:

Descrição	No final de cada período experimental (3, 7 e 14 dias) os animais serão identificados, pesados e posteriormente serão eutanasiados administrando-se, Tiopental (THIOPENTAX - Cristália) dose de 100mg/kg (DL) por via intrapleuraperitoneal associado a lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália).
Substância, dose, via	Tiopental 100 mg/Kg associado a lidocaína 10mg/ml, via intraperitoneal.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

Tendo em vista os dados apresentados na justificativa, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em países subdesenvolvidos.

Com o aumento crescente da população geriátrica acompanhado das doenças típicas do processo de envelhecimento como doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras, e, a difícil recuperação destes pacientes no que se diz respeito ao processo de cicatrização, a constante busca pela otimização do tempo em processos de reparação tecidual e sua qualidade estão sendo respaldadas pelo avanço da tecnologia e a laserterapia de baixa potência, apresenta-se como uma proposta positiva e eficaz para promover a reparação de feridas cutâneas, objetivando reduzir o período de cicatrização e melhora no tipo de cicatrização, levando o indivíduo a um retorno mais rápido de suas atividades.

Data de início: 25/09/2014
Data de término: 05/12/2014

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.
( ) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
( ) Não-Aprovado

Comentário:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 23 de setembro de 2014

Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho